



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104215775 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 17

(21) 申请号 201410447613. X

(22) 申请日 2014. 09. 04

(71) 申请人 北京纳百景弈生物科技有限公司

地址 101111 北京市大兴区北京经济技术开
发区科创六街 88 号院 3 号楼 4-50

(72) 发明人 杨春江 刘勇 朱文壮 孟赓
秦堃 莫勋 马孝斌 聂艳霞
邵宗洋

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书6页
序列表3页

(54) 发明名称

青霉素结合蛋白 PBP6 的 β -内酰胺类抗生素
受体法检测试剂盒制备方法及检测方法

(57) 摘要

本发明的目的是提供一种基于青霉素结合蛋白 PBP6 的 β -内酰胺类抗生素受体法快速检测试剂盒的制备方法, 及其使用检测方法, 以解决传统 ELISA 方法检测 β -内酰胺类药物时漏筛的问题。本发明公布了一种青霉素结合蛋白 PBP6 的 β -内酰胺类抗生素受体法检测试剂盒制备方法, 以及一种采用青霉素结合蛋白 PBP6 的 β -内酰胺类抗生素受体法检测试剂盒对牛奶中 β -内酰胺类药物的含量的间接竞争受体法检测方法, 本发明的有益效果是利用了青霉素结合蛋白 6 能与 β -内酰胺类药物特异性结合的特点, 能在缓冲液体系或者样本基质提取液中特异性地识别该类物质, 不受到其它抗生素类如大环内酯类、喹诺酮类、四环素类的影响。

1. 一种序列为 SEQ ID NO. 1 所示的青霉素结合蛋白 PBP6 的 β -内酰胺类抗生素受体法检测试剂盒制备方法, 步骤如下:

1) 青霉素结合蛋白 6 的重组表达载体的构建及蛋白表达

(1) 采用基因合成的办法合成青霉素结合蛋白 6 序列, 根据合成的序列设计一对引物, 在引物中引入酶切位点 NdeI 和 XhoI, 以合成的基因为模版进行 PCR 扩增, 得到的基因扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳后通过胶回收试剂盒回收扩增产物。

(2) 回收的 PCR 产物和原核表达载体 pET28a 分别用 NdeI 和 XhoI 37°C 双酶切 2h, 酶切后用胶回收试剂盒进行回收; 将回收的基因产物和 pET28a 用 T4 连接酶 16°C 连接 2h, 将连接产物全量转化 DH5 α 感受态细胞, 并涂布到含有卡那青霉素的 LB 平板上 37°C 倒置过夜培养; 挑取单克隆菌落进行 PCR 鉴定, 将阳性单克隆提取质粒进行双酶切鉴定, 将双酶切鉴定正确的单克隆进行 DNA 测序。

(3) 将构建成功的重组质粒转化至大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3), 37°C 倒置过夜培养, 挑取单克隆摇菌做表达检测, 通过 SDS-PAGE 胶鉴定表达量高的单克隆菌株保存甘油菌。将甘油菌扩大培养, 诱导表达后, 收集表达菌体备用。

(4) 将菌悬液加入蛋白酶抑制剂, 收集表达菌体, 加入蛋白酶抑制剂, 超声破碎后去除沉淀, 上清滤膜过滤后以 Ni 亲和柱纯化, 收集纯化的目的蛋白, 以 SDS-PAGE 胶检测纯度。将纯度大于 90% 的目的蛋白过夜透析浓缩脱盐后冻于液氮中备用。

2) 青霉素结合蛋白 6 特异性单克隆抗体的制备:

将纯化好的青霉素结合蛋白 6 以 50 μ g/次·只的量免疫 Balb/C 小白鼠, 初次免疫时与弗氏完全佐剂 (sigma, F5881) 等量混合, 后续免疫时将 PBP6 与弗氏不完全佐剂 (sigma, F5506) 等量混合; 3 次免疫后采血测定血清效价, 后续每次免疫后均采集血清测定效价; 待血清效价大于 1:1000 (OD450nm>1.5) 后, 以 100 μ g/次/只的 PBP6 进行加强免疫, 并于加强免疫后 72 小时内将小鼠处死, 收集其脾细胞与 SP2/0 细胞株进行融合, 制备能分泌 PBP6 单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

使用 PBP6 筛选阳性细胞株, 选择显色较好的细胞株以体内法生产腹水抗体, 并以亲和层析法进行纯化, 收集纯化后的抗体储藏备用;

3) 辣根过氧化物酶标记青霉素结合蛋白 6 特异性单克隆抗体的制备:

采用戊二醛法将辣根过氧化物酶 (HRP) 与 PBP6 单克隆抗体进行标记, 具体操作如下:

(1) 称取 HRP25mg 溶于 1.25% 戊二醛溶液中, 室温静置过夜;

(2) 反应后的酶溶液经 SephadexG-25 层析柱, 用生理盐水洗脱; 流速控制在 1ml/min, 收集棕色流出液; 如体积大于 5ml, 则以 PEG 浓缩至 5ml; 放置 25ml 小烧杯中, 缓慢搅拌;

(3) 将待标记的抗体 12.5mg 用生理盐水稀释至 5ml, 搅拌下逐滴加入酶溶液中;

(4) 用 1M pH9.5 碳酸缓冲液 0.25ml, 继续搅拌 3 小时;

(5) 加 0.2M 赖氨酸 0.25ml, 混匀后, 置室温 2 小时;

(6) 在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵, 置 4°C 1 小时;

(7) 3000rpm 离心半小时, 弃上清; 沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次, 最后沉淀物溶于少量 0.15M pH7.4 的 PBS 中;

(8) 将上述溶液装入透析袋中, 对 0.15M pH7.4 的 PB 缓冲盐水透析, 去除铵离子后 (用茚氏试剂检测), 10,000rpm 离心 30 分钟去除沉淀, 上清液即为 HRP-PBP6, 分装后, 冰冻保

存；

4) 采用戊二醛法合成包被原氨苄青霉素与牛血清白蛋白偶联物 (AMP-BSA)；

5) 制作青霉素结合蛋白 PBP6 的 β -内酰胺类抗生素受体法快速检测试剂盒

将 AMP-BSA 以包被缓冲液,其 pH 值为 9.6,浓度为 0.05M 碳酸盐缓冲液,将其稀释到 $10 \mu\text{g/ml}$,以 $100 \mu\text{l}$ 每孔加入到酶标板中, 37°C 孵育 2 小时后, 4°C 过夜;甩干酶标板中的包被液,用洗涤缓冲液,其 pH7.4,浓度为 0.1M 磷酸盐缓冲液,含有 0.05% 吐温 20,洗板 3 次后,拍干备用;

6) 组装试剂盒

试剂盒中的组份如下:

标准品溶液:用 PBS 溶解并稀释的氨苄青霉素溶液,浓度为 0,0.05,0.2,0.8,2.4 和 $9.6 \mu\text{g/L}$;

青霉素结合蛋白 6 溶液:以 pH7.4 0.1M 磷酸盐缓冲液稀释的 PBP6,蛋白浓度为 0.1mg/ml ;

辣根过氧化物酶标记 PBP6 单克隆抗体溶液:以 PBS 稀释 3000 倍,并含有 0.05% 的叠氮钠作为防腐剂;

单组份 TMB 底物液;

终止液:1M 硫酸溶液。

2. 一种采用青霉素结合蛋白 PBP6 的 β -内酰胺类抗生素受体法检测试剂盒对牛奶中 β -内酰胺类药的含量的间接竞争受体法检测方法,具体步骤如下:

1) 加标准品 / 牛奶样品:用移液器吸取 $50 \mu\text{l}$ 样品或者标准品加入到酶标板为空中,轻轻震荡后放置在水平桌面上;

2) 加青霉素结合蛋白 6:继续加入 $50 \mu\text{l}$ 青霉素结合蛋白 6 溶液,轻轻震荡酶标板,使其中的溶液均匀混合;

3) 加酶标记单克隆抗体:将酶标记物以 $50 \mu\text{l}$ 每孔加入酶标板孔中后,轻轻震荡酶标板,使其中的溶液均匀混合;

4) 孵育,洗板:将酶标板用盖板膜盖好后置于 37°C 温箱,孵育 30min;取出后,甩掉孔中液体,洗板 3 次,排干;

5) 加显色液,终止反应:每孔加入单组份显色底物 $100 \mu\text{l}$,轻轻震荡后,盖上酶标板,置于 37°C 温箱,孵育 15min;完毕后,以 $50 \mu\text{l}$ 终止液终止反应;

6) 读数:以酶标仪 450nm 读取数据,以 630nm 作为参比波长;

7) 结果分析:以 Logit-Log 双对数曲线建立标准曲线,并分析样品检测结果。

青霉素结合蛋白 PBP6 的 β -内酰胺类抗生素受体法检测试剂盒制备方法及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,特别是应用生物技术检测兽药残留领域,涉及了一种基于青霉素结合蛋白 PBP6 的 β -内酰胺类抗生素受体法快速检测试剂盒。

背景技术

[0002] β -内酰胺类抗生素(β -Lactam antibiotics)是一大类含有 β 内酰胺环结构的抗生素。根据 β 内酰胺环结构差异,该类抗生素主要包括青霉素类、头孢菌素类、头霉素类、碳青霉烯类和单环 β -内酰胺类等,其中青霉素类和头孢菌素类发展最为迅速,应用最为广泛。

[0003] β -内酰胺类药物主要通过抑制细胞壁黏肽合成酶,即青霉素结合蛋白活性,阻止细胞壁肽聚糖的合成,使细菌菌体破裂而产生抗菌作用。由于哺乳动物细胞无细胞壁,因此此类药物对人、畜等一般无特殊影响,对细菌宿主毒性较小。

[0004] 由于该类药物药效突出,在生产中应用时也存在一些问题,诸如药物滥用、不按照休药期停药、不同药物乱配伍等,导致药物疗效降低,也对相关动物性食品安全造成了隐患。 β -内酰胺类药物目前最大的问题就是引起部分不适应人群的过敏反应,造成人体健康受损甚至死亡等,此外诸如致癌、致畸、致突变等也有研究报道。

[0005] 由于存在各种潜在危害,目前世界范围内都对 β -内酰胺类药物在动物源性食品中的残留限量做了严格规定,其中欧盟、美国、日本和中国的限量要求基本类似,如对青霉素类药物的要求大多数在 $4\mu\text{g/L}$ 。

[0006] β -内酰胺类抗生素残留检测技术从最初的微生物学方法、薄层色谱法、到如今的大型仪器分析法如气相色谱及气质联用法、高效液相色谱法以及液质联用法和毛细管电泳法以及免疫学分析法等均有报道。近年来,微生物传感器、电化学传感器技术和生物传感器技术等也逐步被应用于此项研究。

[0007] 青霉素结合蛋白(Penicillin binding proteins, PBPs)是广泛存在于细菌表面的一种膜蛋白,是 β -内酰胺类抗生素的主要作用靶位。不同细菌其种类及含量均不相同。但各种菌种的 PBPs 又有许多类似的结构与功能,在细菌生长、繁殖中发挥重要作用。PBPs 结构与数量的改变是产生细菌耐药的一个重要机制。由于能够和青霉素特异性结合,因而也被广泛应用于 β -内酰胺类抗生素的残留检测中。申请号为 CN201010139088.7 和 CN201110057523.6 的中国发明专利等都是以青霉素结合蛋白 2(PBP2)为基础建立了相应的检测方法,而利用青霉素结合蛋白 6(PBP6)建立检测方法在公开号为 CN203376330U、CN203385734U 以及 CN203376317U 中公开了检测试纸条和试纸盒,但没有公开其制作方法。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种基于青霉素结合蛋白 PBP6 的 β -内酰胺类抗生素受体法快速检测试剂盒的制备方法,及其使用检测方法,以解决传统 ELISA 方法检测 β -内酰胺

类药物时漏筛的问题。

[0009] 本发明的技术方案如下：

[0010] 一种序列为 SEQ ID NO.1 所示的青霉素结合蛋白 PBP6 的 β -内酰胺类抗生素受体法检测试剂盒制备方法，步骤如下：

[0011] 1) 青霉素结合蛋白 6 的重组表达载体的构建及蛋白表达

[0012] 人工合成青霉素结合蛋白 6 基因序列，根据基因序列设计合成一对引物，在引物中引入酶切位点 NdeI 和 XhoI，以合成的基因为模板，用合成的引物进行基因扩增，扩增程序如下：94℃预变性 2min，94℃变性 30s，55℃退火 30s，72℃延伸 1min30s，30 个循环，72℃延伸 5min，得到的基因扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳，电泳后通过胶回收试剂盒回收扩增产物。

[0013] 回收的 PCR 产物和原核表达载体 pET28a 分别用 NdeI 和 XhoI 37℃双酶切 2h，酶切后用胶回收试剂盒进行回收；将回收的基因产物和 pET28a 用 T4 连接酶 16℃连接 2h，将连接产物全量转化 DH5 α 感受态细胞，并涂布到含有卡那青霉素的 LB 平板上 37℃倒置过夜培养；挑取单克隆菌落进行 PCR 鉴定，将阳性单克隆提取质粒进行双酶切鉴定，将双酶切鉴定正确的单克隆进行 DNA 测序，对测序结果进行比对，与所需的 DNA 完全一致。

[0014] 将重组质粒转化表达菌株 BL21 (DE3) 中，挑取单克隆菌株摇菌，以 IPTG 进行诱导表达，SDS-PAGE 电泳检测表达结果；大量表达后以镍柱纯化，纯化的蛋白脱盐冻于液氮中备用。

[0015] 2) 青霉素结合蛋白 6 特异性单克隆抗体的制备

[0016] 将纯化好的青霉素结合蛋白 6 以 50 μ g/次·只的量免疫 Balb/C 小白鼠，初次免疫时与弗氏完全佐剂 (sigma, F5881) 等量混合，后续免疫时将 PBP6 与弗氏不完全佐剂 (sigma, F5506) 等量混合；3 次免疫后采血测定血清效价，后续每次免疫后均采集血清测定效价；待血清效价大于 1:1000 (OD_{450nm}>1.5) 后，以 100 μ g/次/只的 PBP6 进行加强免疫，并于加强免疫后 72 小时内将小鼠处死，收集其脾细胞与 SP2/0 细胞株进行融合，制备能分泌 PBP6 单克隆抗体的杂交瘤细胞株；

[0017] 使用 PBP6 筛选阳性细胞株，选择显色较好的细胞株以体内法生产腹水抗体，并以亲和层析法进行纯化，收集纯化后的抗体储藏备用；

[0018] 3) 辣根过氧化物酶标记青霉素结合蛋白 6 特异性单克隆抗体的制备

[0019] 采用戊二醛法将辣根过氧化物酶 (HRP) 与 PBP6 单克隆抗体进行标记，具体操作如下：

[0020] (1) 称取 HRP25mg 溶于 1.25% 戊二醛溶液中，室温静置过夜；

[0021] (2) 反应后的酶溶液经 SephadexG-25 层析柱，用生理盐水洗脱；流速控制在 1ml/min，收集棕色流出液；如体积大于 5ml，则以 PEG 浓缩至 5ml；放置 25ml 小烧杯中，缓慢搅拌；

[0022] (3) 将待标记的抗体 12.5mg 用生理盐水稀释至 5ml，搅拌下逐滴加入酶溶液中；

[0023] (4) 用 1M pH9.5 碳酸缓冲液 0.25ml，继续搅拌 3 小时；

[0024] (5) 加 0.2M 赖氨酸 0.25ml，混匀后，置室温 2 小时；

[0025] (6) 在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵，置 4℃ 1 小时；

[0026] (7) 3000rpm 离心半小时，弃上清；沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次，最后沉淀物溶

于少量 0.15MPH7.4 的 PBS 中；

[0027] (8) 将上述溶液装入透析袋中,对 0.15MPH7.4 的 PB 缓冲盐水透析,去除铵离子后(用萘氏试剂检测),10,000rpm 离心 30 分钟去除沉淀,上清液即为 HRP-PBP6,分装后,冰冻保存；

[0028] 4) 采用戊二醛法合成包被原氨苄青霉素与牛血清白蛋白偶联物 (AMP-BSA)；

[0029] 5) 制作青霉素结合蛋白 PBP6 的 β -内酰胺类抗生素受体法快速检测试剂盒

[0030] 将 AMP-BSA 以包被缓冲液,其 pH 值为 9.6,浓度为 0.05M 碳酸盐缓冲液,将其稀释到 $10 \mu\text{g/ml}$,以 $100 \mu\text{l}$ 每孔加入到酶标板中,37℃ 孵育 2 小时后,4℃ 过夜；甩干酶标板中的包被液,用洗涤缓冲液,其 pH7.4,浓度为 0.1M 磷酸盐缓冲液,含有 0.05% 吐温 20,洗板 3 次后,拍干备用；

[0031] 6) 组装试剂盒

[0032] 试剂盒中的组份如下：

[0033] 标准品溶液：用 PBS 溶解并稀释的氨苄青霉素溶液,浓度为 0,0.05,0.2,0.8,2.4 和 $9.6 \mu\text{g/L}$ ；

[0034] 青霉素结合蛋白 6 溶液：以 pH7.40.1M 磷酸盐缓冲液稀释的 PBP6,蛋白浓度为 0.1mg/ml ；

[0035] 辣根过氧化物酶标记 PBP6 单克隆抗体溶液：以 PBS 稀释 3000 倍,并含有 0.05% 的叠氮钠作为防腐剂；

[0036] 单组份 TMB 底物液；

[0037] 终止液：1M 硫酸溶液；

[0038] 本发明还包括一种采用青霉素结合蛋白 PBP6 的 β -内酰胺类抗生素受体法检测试剂盒对牛奶中 β -内酰胺类药的含量的间接竞争受体法检测方法,具体步骤如下：

[0039] 1) 加标准品 / 牛奶样品：用移液器吸取 $50 \mu\text{l}$ 样品或者标准品加入到酶标板为空中,轻轻震荡后放置在水平桌面上；

[0040] 2) 加青霉素结合蛋白 6：继续加入 $50 \mu\text{l}$ 青霉素结合蛋白 6 溶液,轻轻震荡酶标板,使其中的溶液均匀混合；

[0041] 3) 加酶标记单克隆抗体：将酶标记物以 $50 \mu\text{l}$ 每孔加入酶标板孔中后,轻轻震荡酶标板,使其中的溶液均匀混合；

[0042] 4) 孵育,洗板：将酶标板用盖板膜盖好后置于 37℃ 温箱,孵育 30min；取出后,甩掉孔中液体,洗板 3 次,排干；

[0043] 5) 加显色液,终止反应：每孔加入单组份显色底物 $100 \mu\text{l}$,轻轻震荡后,盖上酶标板,置于 37℃ 温箱,孵育 15min；完毕后,以 $50 \mu\text{l}$ 终止液终止反应；

[0044] 6) 读数：以酶标仪 450nm 读取数据,以 630nm 作为参比波长；

[0045] 7) 结果分析：以 Logit-Log 双对数曲线建立标准曲线,并分析样品检测结果。

[0046] 本发明的有益效果是利用了青霉素结合蛋白 6 能与 β -内酰胺类药物特异性结合的特点,能在缓冲液体系或者样本基质提取液中特异性地识别该类药物,不受到其它抗生素类如大环内酯类、喹诺酮类、四环素类的影响。

[0047] 本发明利用基因重组方法制备得到了青霉素结合蛋白 6,其能与 β -内酰胺类抗生素广谱结合,且灵敏度较高；(2) 基于青霉素结合蛋白 6 建立了受体法 β -内酰胺类抗生

素快速检测试剂盒及其应用于食品中的该类药物残留检测。该试剂盒可以检测包括 7 种青霉素和 5 种头孢菌素类药物在内的 12 种 β -内酰胺类抗生素,检测灵敏度高,操作简便,可用于各类食品中的 β -内酰胺类抗生素的大规模筛选检测,非常适合于基层检测使用。

[0048] 利用这种特异性识别的特性建立的受体法快速检测方法具有灵敏度高、特异性强的特点,对样品前处理要求较低,处理过程简单,能同时检测处理大批量样品。

[0049] 本发明所提供的受体法快速检测试剂盒与传统的 ELISA 试剂盒相比较,检测药物种类多,克服了传统 ELISA 方法检测 β -内酰胺类药物时漏筛的风险,在确保相关动物源性食品安全中将发挥重要作用。

具体实施方式

[0050] 下面结合具体实施方式来进一步描述本发明。本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚,但这些实施例仅是范例性质,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或者替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围。

[0051] 实施例一、青霉素结合蛋白 PBP6 的 β -内酰胺类抗生素受体法检测试剂盒制备方法

[0052] 1) 青霉素结合蛋白 6 的重组表达载体的构建及蛋白表达青霉素结合蛋白 6 序列来源于 Genebank (编号 P08506.2) 或者其它同源序列,首先进行基因序列的人工合成,根据合成的序列设计一对引物,在引物中引入酶切位点 NdeI 和 XhoI,引物序列如下:、上游引物 P1:5' GGAATTC CATATG GCGGAACAAACCGTT 3'

[0053] 下游引物 P2:5' CCG CTCGAG TTAAGAGAACCAGCTGCCGA 3'

[0054] 以合成的基因为模版进行 PCR 扩增,扩增程序如下:94℃ 预变性 2min,94℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min30s,30 个循环,72℃ 延伸 5min,得到的基因扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,电泳后通过胶回收试剂盒回收扩增产物。

[0055] 回收的 PCR 产物和原核表达载体 pET28a 分别用 NdeI 和 XhoI 37℃ 双酶切 2h,酶切后用胶回收试剂盒进行回收;将回收的基因产物和 pET28a 用 T4 连接酶 16℃ 连接 2h,将连接产物全量转化 DH5 α 感受态细胞,并涂布到含有卡那青霉素的 LB 平板上 37℃ 倒置过夜培养;挑取单克隆菌落进行 PCR 鉴定,将阳性单克隆提取质粒进行双酶切鉴定,将双酶切鉴定正确的单克隆进行 DNA 测序,对测序结果进行比对,与所需的 DNA 完全一致。

[0056] 将构建成功的重组质粒转化至大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3),37℃ 倒置过夜培养,挑取单克隆摇菌做表达检测,通过 SDS-PAGE 胶鉴定表达量高的单克隆菌株保存甘油菌。将甘油菌以 1:1000 的比例接种至 50ml 含有 50 μ g/ml Kan 的 LB 液体培养基中,37℃ 210rpm 过夜培养,5000rpm 10min 离心收集菌体,用 5ml LB 液体培养基重悬,然后加入到含有 50 μ g/ml Kan 的 1L LB 液体培养基中 37℃ 210rpm 培养至 OD600 达 0.6,加入终浓度 1mM IPTG 20℃ 195rpm 过夜诱导表达。5000rpm 10min 离心收集菌体,收集的菌体用 50mM Hepes 500mM NaCl 5mM 咪唑 pH 7.4 重悬备用。

[0057] 将菌悬液加入蛋白酶抑制剂,在冰浴条件下超声破碎,超声破碎的溶液 4℃ 18000rpm 30min 离心去除沉淀,上清用 0.22 μ m 滤膜过滤备用。将蛋白通过镍柱亲和层析的方法纯化,所用 Buffer A (50mM Hepes 500mM NaCl 5mM 咪唑 pH 7.4),Buffer B (50mM

Hepes 500mM NaCl 500mM 咪唑 pH 7.4)。最终纯化的蛋白脱盐冻于液氮中备用。

[0058] 2) 青霉素结合蛋白 6 特异性单克隆抗体的制备

[0059] 将纯化好的青霉素结合蛋白 6 以 $50 \mu\text{g}/\text{次} \cdot \text{只}$ 的量免疫 Balb/C 小白鼠, 初次免疫时与弗氏完全佐剂 (sigma, F5881) 等量混合, 后续免疫时将 PBP6 与弗氏不完全佐剂 (sigma, F5506) 等量混合。3 次免疫后采血测定血清效价, 后续每次免疫后均采集血清测定效价。待血清效价大于 $1:1000$ ($\text{OD}_{450\text{nm}} > 1.5$) 后, 以 $100 \mu\text{g}/\text{次} / \text{只}$ 的 PBP6 进行加强免疫, 并于加强免疫后 72 小时内将小鼠处死, 收集其脾细胞与 SP2/0 细胞株进行融合, 制备能分泌 PBP6 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0060] 使用 PBP6 筛选阳性细胞株, 选择显色较好的细胞株以体内法生产腹水抗体, 并以亲和层析法进行纯化, 收集纯化后的抗体储藏备用。

[0061] 3) 辣根过氧化物酶标记青霉素结合蛋白 6 特异性单克隆抗体的制备

[0062] 采用戊二醛法将辣根过氧化物酶 (HRP) 与 PBP6 单克隆抗体进行标记, 具体操作如下:

[0063] (1) 称取 HRP25mg 溶于 1.25% 戊二醛溶液中, 室温静置过夜。

[0064] (2) 反应后的酶溶液经 SephadexG-25 层析柱, 用生理盐水洗脱。流速控制在 $1\text{ml}/\text{min}$, 收集棕色流出液。如体积大于 5ml, 则以 PEG 浓缩至 5ml。放置 25ml 小烧杯中, 缓慢搅拌。

[0065] (3) 将待标记的抗体 12.5mg 用生理盐水稀释至 5ml, 搅拌下逐滴加入酶溶液中。

[0066] (4) 用 1M pH9.5 碳酸缓冲液 0.25ml, 继续搅拌 3 小时。

[0067] (5) 加 0.2M 赖氨酸 0.25ml, 混匀后, 置室温 2 小时。

[0068] (6) 在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵, 置 4°C 1 小时。

[0069] (7) 3000rpm 离心半小时, 弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次, 最后沉淀物溶于少量 0.15M pH7.4 的 PBS 中。

[0070] (8) 将上述溶液装入透析袋中, 对 0.15M pH7.4 的 PB 缓冲盐水透析, 去除铵离子后 (用茚氏试剂检测), 10,000rpm 离心 30 分钟去除沉淀, 上清液即为 HRP-PBP6, 分装后, 冰冻保存。

[0071] 4) 包被原氨苄青霉素与牛血清白蛋白偶联物 (AMP-BSA) 的制备

[0072] 采用戊二醛法合成 AMP-BSA。

[0073] 5) 制作青霉素结合蛋白 PBP6 的 β -内酰胺类抗生素受体法快速检测试剂盒

[0074] 将 AMP-BSA 以包被缓冲液 (pH9.6, 0.05M 碳酸盐缓冲液) 稀释到 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, 以 $100 \mu\text{l}$ 每孔加入到酶标板中, 37°C 孵育 2 小时后, 4°C 过夜。甩干酶标板中的包被液, 用洗涤缓冲液 (pH7.4, 0.1M 磷酸盐缓冲液, 含有 0.05% 吐温 20) 洗板 3 次后, 拍干备用。

[0075] 试剂盒中的其它组份如下:

[0076] 标准品溶液: 用 PBS 溶解并稀释的氨苄青霉素溶液, 浓度为 0, 0.05, 0.2, 0.8, 2.4 和 $9.6 \mu\text{g}/\text{L}$;

[0077] 青霉素结合蛋白 6 溶液: 以 pH7.4, 0.1M 磷酸盐缓冲液稀释的 PBP6, 蛋白浓度为 $0.1\text{mg}/\text{ml}$;

[0078] 辣根过氧化物酶标记 PBP6 单克隆抗体溶液: 以 PBS 稀释 3000 倍, 并含有 0.05% 的叠氮钠作为防腐剂;

[0079] 单组份 TMB 底物液 : 商品化成品 ;

[0080] 终止液 : 1M 硫酸溶液。

[0081] 实施例二、牛奶中 β -内酰胺类药的含量的间接竞争受体法检测方法

[0082] 以牛奶样本为例, 检测时无须任何前处理, 直接点到酶标板即可。具体步骤如下 :

[0083] (1) 加标准品 / 样品 : 用移液器吸取 50 μ l 样品或者标准品加入到酶标板为空中, 轻轻震荡后放置在水平桌面上。

[0084] (2) 加青霉素结合蛋白 6 : 继续加入 50 μ l 青霉素结合蛋白 6 溶液, 轻轻震荡酶标板, 使其中的溶液均匀混合 ;

[0085] (3) 加酶标记单克隆抗体 : 将酶标记物以 50 μ l 每孔加入酶标板孔中后, 轻轻震荡酶标板, 使其中的溶液均匀混合 ;

[0086] (4) 孵育, 洗板 : 将酶标板用盖板膜盖好后置于 37℃ 温箱, 孵育 30min。取出后, 甩掉孔中液体, 洗板 3 次, 排干 ;

[0087] (5) 加显色液, 终止反应 : 每孔加入单组份显色底物 100 μ l, 轻轻震荡后, 盖上酶标板, 置于 37℃ 温箱, 孵育 15min。完毕后, 以 50 μ l 终止液终止反应。

[0088] (6) 读数 : 以酶标仪 450nm 读取数据, 以 630nm 作为参比波长。

[0089] (7) 结果分析 : 以 Logit-Log 双对数曲线建立标准曲线, 并分析样品检测结果。

[0090] 实施例三、试剂盒的准确度和精密度测试

[0091] 取空白的牛奶样本 20 份, 将其中添加青霉素 G 标准品, 使其浓度达到 4 μ g/L, 用制备好 β -内酰胺类受体法试剂盒按操作说明进行操作, 检测其中的青霉素 G 含量, 计算样品回收率作为准确度的测定结果, 同时以测定结果的变异系数作为试剂盒的精密度。具体测定结果如下表所示。

[0092] 表 1 准确度和精密度测定结果

[0093]

样品编号	测定结果	测定结果	测定结果	测定结果
1 号 -5 号	92.5%	105.0%	90.0%	70.0%
6 号 -10 号	67.5%	85.0%	102.5%	72.5%
11 号 -15 号	107.5%	80.0%	92.5%	90.0%
16 号 -20 号	100.0%	90.0%	95.0%	105.0%
平均回收率	90.3%	变异系数	13.9%	

[0094] 由表可以知道, 试剂盒对牛奶样品的检测在添加 4 μ g/L 青霉素 G 时, 回收率在 67.5% ~ 107.5%, 平均回收率为 90.3%, 变异系数为 13.9%。

[0095] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已, 并不用以限制本发明, 凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 北京纳百景弈生物科技有限公司

<120> 青霉素结合蛋白 PBP6 的 β -内酰胺类抗生素受体法检测试剂盒制备方法及其检测方法

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 249

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 1

Met Thr Gln Tyr Ser Ser Leu Leu Arg Gly Leu Ala Ala Gly Ser Ala

1 5 10 15

Phe Leu Phe Leu Phe Ala Pro Thr Ala Phe Ala Ala Glu Gln Thr Val

20 25 30

Glu Ala Pro Ser Val Asp Ala Arg Ala Trp Ile Leu Met Asp Tyr Ala

35 40 45

Ser Gly Lys Val Leu Ala Glu Gly Asn Ala Asp Glu Lys Leu Asp Pro

50 55 60

Ala Ser Leu Thr Lys Ile Met Thr Ser Tyr Val Val Gly Gln Ala Leu

65 70 75 80

Lys Ala Asp Lys Ile Lys Leu Thr Asp Met Val Thr Val Gly Lys Asp

85 90 95

Ala Trp Ala Thr Gly Asn Pro Ala Leu Arg Gly Ser Ser Val Met Phe

100 105 110

[0002]

Leu Lys Pro Gly Asp Gln Val Ser Val Ala Asp Leu Asn Lys Gly Val
115 120 125

Ile Ile Gln Ser Gly Asn Asp Ala Cys Ile Ala Leu Ala Asp Tyr Val
130 135 140

Ala Gly Ser Gln Glu Ser Phe Ile Gly Leu Met Asn Gly Tyr Ala Lys
145 150 155 160

Lys Leu Gly Leu Thr Asn Thr Thr Phe Gln Thr Val His Gly Leu Asp
165 170 175

Ala Pro Gly Gln Phe Ser Thr Ala Arg Asp Met Ala Leu Leu Gly Lys
180 185 190

Ala Leu Ile His Asp Val Pro Glu Glu Tyr Ala Ile His Lys Glu Lys
195 200 205

Glu Phe Thr Phe Asn Lys Ile Arg Gln Pro Asn Arg Asn Arg Leu Leu
210 215 220

Trp Ser Ser Asn Leu Asn Val Asp Gly Met Lys Thr Gly Thr Thr Ala
225 230 235 240

Gly Ala Gly Tyr Asn Leu Val Ala Ser Ala Thr Gln Gly Asp Met Arg
245 250 255

Leu Ile Ser Val Val Leu Gly Ala Lys Thr Asp Arg Ile Arg Phe Asn
260 265 270

Glu Ser Glu Lys Leu Leu Thr Trp Gly Phe Arg Phe Phe Glu Thr Val
275 280 285

[0003]

Thr Pro Ile Lys Pro Asp Ala Thr Phe Val Thr Gln Arg Val Trp Phe
290 295 300

Gly Asp Lys Ser Glu Val Asn Leu Gly Ala Gly Glu Ala Gly Ser Val
305 310 315 320

Thr Ile Pro Arg Gly Gln Leu Lys Asn Leu Lys Ala Ser Tyr Thr Leu
325 330 335

Thr Glu Pro Gln Leu Thr Ala Pro Leu Lys Lys Gly Gln Val Val Gly
340 345 350

Thr Ile Asp Phe Gln Leu Asn Gly Lys Ser Ile Glu Gln Arg Pro Leu
355 360 365

Ile Val Met Glu Asn Val Glu Glu Gly Gly Phe Phe Gly Arg Val Trp
370 375 380

Asp Phe Val Met Met Lys Phe His Gln Trp Phe Gly Ser Trp Phe Ser
385 390 395 400

专利名称(译)	青霉素结合蛋白PBP6的β-内酰胺类抗生素受体法检测试剂盒制备方法及检测方法		
公开(公告)号	CN104215775A	公开(公告)日	2014-12-17
申请号	CN201410447613.X	申请日	2014-09-04
[标]申请(专利权)人(译)	北京纳百景弈生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京纳百景弈生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京纳百景弈生物科技有限公司		
[标]发明人	杨春江 刘勇 朱文壮 孟赓 秦堃 莫勋 马孝斌 聂艳霞 邰宗洋		
发明人	杨春江 刘勇 朱文壮 孟赓 秦堃 莫勋 马孝斌 聂艳霞 邰宗洋		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/566		
其他公开文献	CN104215775B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种基于青霉素结合蛋白PBP6的β-内酰胺类抗生素受体法快速检测试剂盒的制备方法, 及其使用检测方法, 以解决传统ELISA方法检测β-内酰胺类药物时漏筛的问题。本发明公布了一种青霉素结合蛋白PBP6的β-内酰胺类抗生素受体法检测试剂盒制备方法, 以及一种采用青霉素结合蛋白PBP6的β-内酰胺类抗生素受体法检测试剂盒对牛奶中β-内酰胺类药的含量的间接竞争受体法检测方法, 本发明的有益效果是利用了青霉素结合蛋白6能与β-内酰胺类药物特异性结合的特点, 能在缓冲液体系或者样本基质提取液中特异性地识别该类药物, 不受到其它抗生素类如大环内酯类、喹诺酮类、四环素类的影响。

[illegible]