



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102455357 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 16

(21) 申请号 201010521870. 5

(22) 申请日 2010. 10. 21

(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镇生命园路 29 号创新大厦 B 座 236、240 室

(72) 发明人 何方洋 万宇平 冯才伟 冯静
汪善良 罗晓琴 何丽霞 赵正苗
冯才茂 崔海峰 李勇 王建霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

C07K 16/44 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测 β -内酰胺酶的试剂盒及方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测 β -内酰胺酶的试剂盒及方法。试剂盒包括微孔试剂、酶测试剂和试纸,所述微孔试剂中冻干有头孢类药物特异性-胶体金标记物,所述酶测试剂中冻干有青霉素药物,所述头孢类药物特异性抗体为头孢类药物单克隆抗体或头孢类药物多克隆抗体;所述试纸由底板、样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜,依次连接组成,所述反应膜上包括检测区和质控区,检测区包被有头孢类药物-载体蛋白偶联物,质控区包被有抗抗体。所述反应膜上包括检测区和质控区,检测区包被有头孢类药物和载体蛋白的偶联物,质控区包被有抗抗体。用本发明试剂盒检测 β -内酰胺酶的方法,简便、快速、直观、准确、适用范围广、成本低、易推广使用。

1. 一种检测 β -内酰胺酶的试剂盒,其特征在于包括试纸、微孔试剂和酶测试剂,所述试纸由样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜、底板组成,所述反应膜上有检测区和质控区,检测区包被有头孢类药物-载体蛋白偶联物,质控区包被有抗抗体,所述微孔试剂上冻干有头孢类药物特异性抗体-胶体金标记物,所述酶测试剂板孔上冻干有青霉素药物。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述试纸由样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜依次黏贴在底板上组成,所述微孔试剂和酶测试剂板孔上均具有微孔塞。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于:所述保护膜粘贴在试纸两端,其中一端有MAX标记线,另一端为手持端。

4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于:所述检测区位于近于有MAX标记的保护膜的一侧,所述质控区位于远离所述有MAX标记的保护膜的一侧。

5. 根据权利要求4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,所述载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

6. 根据权利要求1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。

7. 权利要求1-6任一项所述的试剂盒在检测 β -内酰胺酶中的应用。

8. 一种制备权利要求1-6任一项所述的试剂盒方法,其包括步骤:

- 1) 制备冻干有头孢类药物特异性抗体-胶体金标记物的微孔试剂;
- 2) 制备冻干有青霉素药物的酶测试剂;
- 3) 制备具有包被头孢类药物-载体蛋白偶联物的检测区和包被抗抗体的质控区的反应膜;
- 4) 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;
- 5) 将1)、2)和4)制备好的冻干有头孢类药物特异性抗体-胶体金标记物的微孔试剂和试纸组装成试剂盒。

9. 一种 β -内酰胺酶的检测方法,其包括步骤:

- 1) 用权利要求1-6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 -内酰胺酶的试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测 β -内酰胺酶的试剂盒及方法。

背景技术

[0002] 随着人们生活水平的提高,动物源食品中的药物残留日益受到国际社会的重视。 β -内酰胺类抗生素作为发现最早、用量最多的一类抗生素,在牛乳及动物组织中残留检出报道最多。 β -内酰胺类抗生素是指化学结构中含有 β -内酰胺环的一类抗生素,主要包括青霉素类和头孢菌素类,其作用特点是能够抑制细菌黏肽转肽酶的活性,从而阻止细菌细胞壁的合成,呈现杀菌活性。在动物生产中, β -内酰胺类抗生素广泛用于控制奶牛的乳房炎,治疗动物尿道、胃肠道和呼吸道感染等。但由于其使用方法不当或不遵守休药期规定等原因,均可造成它在畜产品中的残留,给人类健康带来严重危害,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。

[0003] 目前市场上出现了“生鲜牛乳抗生素分解剂”,该分解剂的主要成分是 β -内酰胺酶,在我国 β -内酰胺酶是不允许使用的食品添加剂,严禁将 β -内酰胺酶加入到有抗生素的奶中用于分解抗生素。目前对 β -内酰胺酶常用的检测方法主要有液相法及微生物法,但是液相法虽然准确度高,但是存在操作复杂,对检测人员要求高,检测时间长,成本高等缺点,微生物检测方法成本低,但是检测灵敏度低,容易出现假阳性,耗时长,不适合现场使用。因此,在实践中有必要建立一种敏感度高、操作简单、成本低、适合大规模推广的检测方法。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种检测 β -内酰胺酶的试剂盒。

[0005] 本发明所提供的试剂盒包括微孔试剂、酶测试剂和试纸,酶测试剂和微孔试剂均具有微孔塞,试纸包括底板、样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜,其依次连接;所述微孔试剂中冻干有头孢类药物特异性抗体-胶体金标记物,所述酶测试剂中冻干有青霉素药物;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;反应膜上包被有检测区和质控区;当头孢类药物特异性抗体为头孢类药物单克隆抗体时,检测区包被有头孢类药物-载体蛋白偶联物,质控区包被羊抗鼠抗抗体;当头孢类药物特异性抗体为头孢类药物多克隆抗体时,检测区包被头孢类药物-载体蛋白偶联物,质控区包被羊抗兔抗抗体。

[0006] 所述保护膜粘贴在试纸两端,其中一端粘贴在样品吸收垫上,为检测端,上面有MAX 标记线,另一端粘贴在吸水垫上为手柄端。

[0007] 所述检测区位于近于有MAX 标记的保护膜的一侧,所述质控区位于远离所述有MAX 标记线的保护膜的一侧。

[0008] 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、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

[0009] 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。

[0010] 所述底板可由不吸水的韧性材料制成,如硬质塑料、不吸水硬纸,具体可为PVC板材;样品吸收垫可为吸滤纸或虑油纸;吸水垫为滤纸;反应膜可为硝酸纤维素膜或为纯纤维素膜;所述保护膜可为PE材质的保护膜。

[0011] 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:

[0012] 1) 制备冻干有头孢类药物特异性抗体-胶体金标记物的微孔试剂;

[0013] 2) 制备冻干有青霉素药物的酶测试剂;

[0014] 3) 制备具有包被头孢类药物-载体蛋白偶联物的检测区和包被抗抗体的质控区的反应膜;

[0015] 4) 将3)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

[0016] 5) 将1)、2)和3)制备好的微孔试剂、酶测试剂和试纸组装成试剂盒。

[0017] 具体的说,步骤包括:

[0018] 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;

[0019] 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;

[0020] 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;

[0021] 4) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

[0022] 5) 将制备的头孢类药物特异性抗体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;

[0023] 6) 将头孢类药物特异性抗体-胶体金标记物冻干在微孔试剂微孔中后,将微孔试剂加上微孔塞;

[0024] 7) 将青霉素药物冻干到酶测试剂微孔中;

[0025] 8) 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;

[0026] 9) 在底板上按顺序贴上样品吸收垫、反应膜、吸水垫和保护膜;

[0027] 10) 将制备好的微孔试剂、酶测试剂和试纸装入组装成试剂盒,2-8℃条件下保存6个月

[0028] 本发明的另一个目的提供了一种牛奶样本中 β -内酰胺酶的检测方法。

[0029] 用本发明上述任一所述试剂盒进行检测。

[0030] 本发明试剂盒的检测原理:将待检样本液滴加于酶测试剂,混匀后,40℃~50℃保温25min,后室温回温10~15min,将回温后的酶测试剂滴加于微孔试剂条中,混匀,孵育5min,将标有MAX线标记端向下,插入孵育后的微孔试剂,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;若待检样品液含有中 β -内酰胺酶,则 β -内酰胺酶分解酶测试剂中青霉素药物,则金标抗体上的抗原结合位点不能被封闭,进而金标抗体会与反应膜上头孢类药物-载体蛋白偶联物结合,检测区显色,同时抗抗体也可与金标抗体结合,质控区显色;若待检样品液中不含有 β -内酰胺酶很低,则酶测试剂中的青霉素不会被分解,则扩

散过程中青霉素药物可与金标抗体结合,进而完全封闭金标抗体上 β -内酰胺类抗生素的抗原结合点,阻止金标抗体与反应膜上偶联头孢类药物载体蛋白,检测区不显色。如果质控区不显色,则试纸失效。如图 3 所示。

[0031] 阴性:当质控区(C)显示红色条带,而检测区(T)不显色,判为阴性,用“-”表示。

[0032] 阳性:当质控区(C)显示红色条带,而检测区(T)显色,判为阳性,用“+”表示。

[0033] 无效:当质控区(C)不显示红色条带,则无论检测区(T)是否出现红色条带,试纸均失效。

[0034] 本发明的试剂盒具有敏感度高、特异性高、成本低、操作简单、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,保证了检测结果的可靠性;将金标抗体冻干在微孔试剂中,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。用本发明试剂盒检测 β -内酰胺类抗生素的方法,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

[0035] 图 1 为试纸剖面结构示意图。

[0036] 图 2 为试纸的俯视图。

[0037] 图 3 为试纸检测结果判定图。

具体实施方式

[0038] 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。

[0039] 实施例 1、检测 β -内酰胺酶的试剂盒的构成

[0040] 一、微孔试剂

[0041] 所述微孔试剂上具有微孔塞;

[0042] 所述微孔试剂上冻干有胶体金标记的头孢类药物单克隆抗体,包被量 0.15-0.20 μ g/ml。

[0043] 二、酶测试剂

[0044] 所述酶测试剂微孔板具有微孔塞;

[0045] 所述酶测试剂微孔板上冻干有青霉素药物,包被量 0.15-0.20 μ g/ml。

[0046] 二、试纸(称作试纸条)(图 1):

[0047] 所述试纸是由底板、样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜组成;

[0048] 所述样品吸收垫 1、反应膜 2、吸水垫 3 和保护膜依次按顺序黏贴在所述底板 6 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;

[0049] 所述试纸两端黏贴有保护膜。

[0050] 保护膜 7-1 覆盖在吸水垫上手柄端,保护膜 7-2 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(图 2)。

[0051] 所述反应膜上有检测区 4 和质控区 5,检测区和质控区均为与所述试纸条的长相

垂直的条带状,检测区位于近于有 MAX 标记线的保护膜的一侧,质控区位于远离所述有 MAX 标记的保护膜的一侧。检测区包被有头孢类药物-载体蛋白偶联物(头孢类药物-牛血清白蛋白的偶联物),质控区包被有羊抗鼠抗抗体。

[0052] 底板由 PVC 板材制成;样品吸收垫由尼龙膜制成;吸水垫为虑纸;反应膜为硝酸纤维素膜;所述保护膜为 PE 材质的保护膜。

[0053] 将上述试纸与微孔试剂、酶测试剂组装成试剂盒,在 2 ~ 8°C 的环境中储存,有效期 6 个月。

[0054] 实施例 2、实施例 1 中所述试剂盒的制备方法

[0055] 一、试剂盒的制备

[0056] 该试剂盒的制备方法主要包括如下步骤:

[0057] 1) 制备冻干有头孢类药物单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂板;

[0058] 2) 制备冻干有青霉素药物的酶测试剂;

[0059] 3) 制备具有包被头孢类药物-载体蛋白偶联物的检测区和包被羊抗鼠抗抗体的质控区的反应膜;

[0060] 4) 将 3) 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;

[0061] 5) 将 1)、2) 和 3) 制备好的微孔试剂、酶测试剂和试纸组装成试剂盒。

[0062] 下面分步详细叙述:

[0063] (一) 各部件的制备

[0064] 1、头孢类药物-载体蛋白偶联物的合成与鉴定

[0065] 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。

[0066] 2) 免疫原的制备-头孢类药物与卵清蛋白偶联物合成

[0067] 取头孢匹林的钠盐 40mg,用 1.5ml 双蒸水溶解,得到 (I) 液;取 EDC40mg 和 NHS60mg 用 0.5ml 水溶解得到 (II) 液;在搅拌状态下将 (II) 加入 (I) 中,反应 1h,得到 (III) 液;取卵清蛋白 60mg 用 8ml 水溶解,得到 (IV) 液;将 (IV) 加入 (III) 中,室温搅拌反应 24h 分别得到免疫原,用 0.02M PBS 透析 3 天,分装、冻存。

[0068] 3) 包被原的制备-头孢类药物与牛血清白蛋白偶联物合成

[0069] 取头孢匹林的钠盐 40mg,用 1.5ml 双蒸水溶解,得到 (I) 液;取 EDC40mg 和 NHS60mg 用 0.5ml 水溶解得到 (II) 液;在搅拌状态下将 (II) 加入 (I) 中,反应 1h,得到 (III) 液;取牛血清白蛋白 100mg 用 8ml 水溶解,得到 (IV) 液;将 (IV) 加入 (III) 中,室温搅拌反应 24h 分别得到免疫原,用 0.02M PBS 透析 3 天,分装、冻存。

[0070] 4) 头孢类药物-载体偶联物的鉴定

[0071] 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。

[0072] 2、头孢类药物单克隆抗体的制备

[0073] (1) 制备单抗

[0074] a. 动物免疫

[0075] 将步骤 1 得到的免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内,免疫剂量为 150 μ g/ 只,使其产生抗血清。

[0076] b. 细胞融合和克隆化

[0077] 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。

[0078] c. 细胞冻存和复苏

[0079] 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 $^{\circ}$ C 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0080] d. 单克隆抗体的制备与纯化

[0081] 增量培养法:将杂交瘤细胞置于细胞培养基中,在 37 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 保存。

[0082] 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。

[0083] 3、羊抗鼠抗抗体的制备: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。

[0084] 4、头孢类药物单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0085] (1) 胶体金的制备

[0086] 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。

[0087] (2) 头孢类药物单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0088] 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 μ g 抗体/ml 胶体金的标准向胶体金溶液中加入上述头孢类药物单克隆抗体,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 $^{\circ}$ 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-胶体金标记物溶液的浓度为 50 μ g 单抗/ml 溶液,置 4 $^{\circ}$ C 备用。

[0089] 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)。

[0090] 5、将头孢类药物单克隆抗体-胶体金标记物冻干到微孔试剂上

[0091] 向微孔试剂微孔板中加入 100 μ l 头孢类药物单克隆抗体-胶体金标记物,放入冷冻干燥机中,在冷阱温度为 -70 $^{\circ}$ C 条件下,预冻 4h 后,再冻干 14h,即可取出,得到冻干有头孢类药物单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂。

[0092] 6、将青霉素药物冻干到酶测试剂微孔板上

[0093] 向酶测试剂微孔板中加入 100 μ l 青霉素药物,放入冷冻干燥机中,在冷阱温度

为 -70°C 条件下, 预冻 4h 后, 再冻干 14h, 即可取出, 得到冻干有青霉素药物的酶测试剂。

[0094] 7、样品吸收垫的准备: 将样品吸收垫置于含牛血清白蛋白 (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, 37°C 烘 2h 备用;

[0095] 8、反应膜的制备

[0096] 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区, 包被量为 $1.0\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 用 0.01M、pH 7.4PBS 缓冲液将羊抗鼠 IgG 抗体稀释到 $200\mu\text{g}/\text{ml}$, 用 Biodot 点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的质控区, 包被量为 $1.0\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。将包被好的反应膜置于 37°C 条件下干燥 2h, 备用。

[0097] (二) 各部件的组装

[0098] 1、试纸的组装:

[0099] 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; 在组装好试纸两端黏贴保护膜。

[0100] 2、试剂盒组装

[0101] 将上述步骤 1 得到试纸与微孔试剂、酶测试剂组装成试剂盒, 在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 的环境中储存, 有效期 6 个月。

[0102] 二、试剂盒的灵敏度和特异性检验

[0103] (一) 灵敏度试验

[0104] 将 β -内酰胺酶标准品 (购 sigma 公司, 产品编号 61305); 稀释成如下不同浓度: 0、0.5、1、2IU/L; 所用的稀释液为 pH 为 6.6、0.2mol/L 的碳酸盐缓冲液。

[0105] 用试剂盒进行检测。每次向酶测试剂微孔中滴加 $250\mu\text{l}$ 待检样品, $40^{\circ}\text{C}\sim 50^{\circ}\text{C}$ 保温 25min, 后室温回温 $10\sim 15\text{min}$; 将回温后的酶测试剂滴加于微孔试剂板中, 混匀, 孵育 5min, 将标有 MAX 标记线端向下, 插入孵育后的微孔试剂反应, 结果为: 滴试 0、0.5IU/L β -内酰胺酶时, 试纸上检测区不显色, 质控区显色, 呈阴性; 滴试 1、2IU/L β -内酰胺酶时, 试纸上检测区和质控区均显色, 呈阳性; 表明, 本试剂盒对 β -内酰胺酶检测灵敏度为 1IU/L。

[0106] 实施例 3、试纸的应用

[0107] 一、用实施例 1 中所述试剂盒检测牛奶中 β -内酰胺酶

[0108] 本发明的试剂盒可以检测牛奶样品。一般的检测方法如下:

[0109] 1) 检测方法

[0110] 向酶标试剂板孔中滴加需检测的样品溶液, 混匀后, 45°C 保温 25min, 室温回温 10min, 将回温后的酶测试剂滴加 $200\mu\text{l}$ 于微孔试剂板中, 混匀后, 将试纸有 MAX 线标记端朝下插入微孔试剂板孔中, 在 5min 内观看结果。

[0111] 2) 结果判定

[0112] β -内酰胺酶在样品中浓度高于或等于试剂盒最低检测限时, β -内酰胺酶分解酶测试剂中的青霉素药物, 胶体金抗体则不能与青霉素药物结合, 从而在检测区内金标抗体与头孢类药物-载体蛋白偶联物结合而出现红色条带, 呈阳性。阴性样品在检测过程中, 青霉素药物不被分解, 与金标抗体结合后, 金标抗体的 β -内酰胺类抗生素的抗原结合位

点被封闭,金标抗体将不与检测区头孢类药物-载体蛋白偶联物结合,检测区不显色,质控区显色。如图 3 所示。

[0113] 阳性:当质控区 (C) 显示出红色条带,而检测区 (T) 不显色时,判为阴性,用“-”。如图 3a 所示

[0114] 阳性:当质控区 (C) 显示出红色条带,检测区 (T) 显示红色条带,判为阳性,用“+”。如图 3b 所示

[0115] 无效:当质控区 (C) 不显示出红色条带,则无论测试区 (T) 显示出红色条带与否,该试纸判为无效。如图 3c、3d 所示

[0116] 下面具体举例:

[0117] 取已知 β -内酰胺酶含量大于 1IU/L 的牛奶阳性样品 20 份和浓度小于 1IU/L 的牛奶样本阴性样品 20 份,用 3 个批次生产的试剂盒分别进行检测,计算其阴阳性率。

[0118] 表 1、检测阳性样本结果

	浓度 批次	阳性牛奶样品 (20 份)
[0119]	1	20 份阳性
	2	20 份阳性
	3	20 份阳性

[0120] 表 2、检测阴性样本结果

	浓度 批次	阴性牛奶样品 (20 份)
[0121]	1	20 份阴性
	2	20 份阴性
	3	20 份阴性

[0122] 结果表明:用 3 个批次生产的试剂盒检测阳性牛奶样本时,阳性符合率为 100%;检测 20 份阴性牛奶样本时,阴性符合率为 100%。本发明的检测 β -内酰胺酶试剂盒可以对牛奶中 β -内酰胺酶进行快速检测。

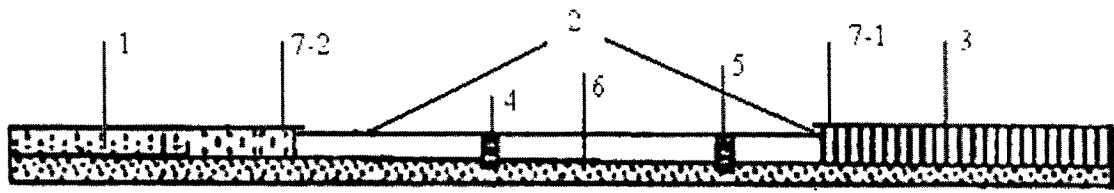


图 1

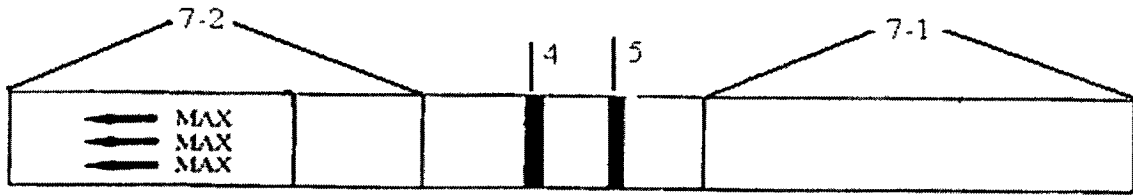


图 2

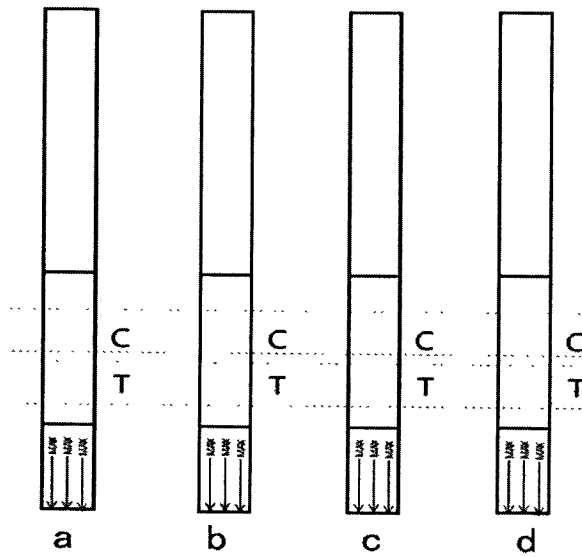


图 3

专利名称(译)	一种检测β-内酰胺酶的试剂盒及方法		
公开(公告)号	CN102455357A	公开(公告)日	2012-05-16
申请号	CN201010521870.5	申请日	2010-10-21
[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 冯才伟 冯静 汪善良 罗晓琴 何丽霞 赵正苗 冯才茂 崔海峰 李勇 王建霞		
发明人	何方洋 万宇平 冯才伟 冯静 汪善良 罗晓琴 何丽霞 赵正苗 冯才茂 崔海峰 李勇 王建霞		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532 C07K16/44		
其他公开文献	CN102455357B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测β-内酰胺酶的试剂盒及方法。试剂盒包括微孔试剂、酶测试剂和试纸，所述微孔试剂中冻干有头孢类药物特异性-胶体金标记物，所述酶测试剂中冻干有青霉素药物，所述头孢类药物特异性抗体为头孢类药物单克隆抗体或头孢类药物多克隆抗体；所述试纸由底板、样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜，依次连接组成，所述反应膜上包括检测区和质控区，检测区包被有头孢类药物-载体蛋白偶联物，质控区包被有抗抗体。所述反应膜上包括检测区和质控区，检测区包被有头孢类药物和载体蛋白的偶联物，质控区包被有抗抗体。用本发明试剂盒检测β-内酰胺酶的方法，简便、快速、直观、准确、适用范围广、成本低、易推广使用。

浓度 批次	阳性牛奶样品 (20份)
1	20份阳性
2	20份阳性
3	20份阳性