

[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 200910184029.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

C12N 15/06 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

[43] 公开日 2010年1月13日

[11] 公开号 CN 101625365A

[22] 申请日 2009.8.11

[21] 申请号 200910184029.9

[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  
杨婷婷 蔡建荣 马祯婉

权利要求书 2 页 说明书 4 页

[54] 发明名称

一种利用光纤生物传感器快速检测乳制品中  
 $\beta$ -内酰胺酶的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种利用光纤生物传感器快速检测乳制品中  $\beta$ -内酰胺酶的方法，涉及一种光纤生物传感器，其包括光学系统、电子学系统、数据采集系统及控制与处理系统，其还包括光纤和传感器，其中光纤材料为聚苯乙烯，传感器上设有敏感膜，敏感膜上含有利用戊二醛固定的 Cy5 标记的  $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体。该单克隆抗体通过以  $\beta$ -内酰胺酶为抗原免疫小鼠，细胞融合等过程制备。本发明具有高灵敏度、抗电磁辐射、抗电子频率干扰、抗腐蚀性，且仪器体积小，方便携带，所需检测样品少，响应时间快，易于操作和成本低廉等优点。可广泛用于液态牛奶、奶粉、固体样品等乳制品中  $\beta$ -内酰胺酶的检测。

1. 一种利用光纤生物传感器快速检测乳制品中  $\beta$ -内酰胺酶的方法，其步骤为：

(1)  $\beta$ -内酰胺酶抗体的制备

取  $\beta$ -内酰胺酶 100  $\mu\text{g}$ 、卡介苗 5 mg，与等体积佛氏完全佐剂研磨后注入 6 周龄雌性 BALBPC 小鼠腹腔，以后采用佛氏不完全佐剂，隔周腹腔注射 5 次，融合前 3 天腹腔注射 50  $\mu\text{g}$   $\beta$ -内酰胺酶标准溶液，以 50% PEG4000 为融合剂，将小鼠脾细胞与 NS1 细胞融合，IMDM2HAT 选择培养，2 周后换 HT 培养液培养。以  $\beta$ -内酰胺酶为抗原，经间接 ELISA 法筛选阳性克隆后的杂交瘤细胞，所得细胞株继续扩增培养。将阳性细胞株注入 BALBPC 小鼠腹腔，诱生腹水，用兔抗鼠免疫球蛋白及琼脂双扩散法检测  $\beta$ -内酰胺酶抗体。

(2) 包被抗体的制备

用包被液将  $\beta$ -内酰胺酶抗体稀释至一定浓度并装入毛细管中，将光纤插入，4 $^{\circ}\text{C}$  孵育 12~16 h，4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

(3) 标记抗体的制备

将所测标本的抗体用稀释液稀释到一定浓度，在碱性环境下与荧光素染料 Cy5 结合后，通过凝胶过滤分离到标记了 Cy5 的单克隆抗体。

(4) 固定抗体的制备

将通过三氨基丙基三乙基硅烷等硅烷类物质将光纤表面硅烷化，然后借助双功能交联剂戊二醛将标记了 Cy5 的  $\beta$ -内酰胺酶单抗进行固定。

(5) 标准曲线的制作

将标记了 Cy5 的  $\beta$ -内酰胺酶单抗固定到活化器上，放入光纤生物传感器，取一定量的不同浓度的  $\beta$ -内酰胺酶标准溶液滴加到传感器敏感膜上，再将传感器插入到系统接口中，按下测试键，响应一段时间，约 300 s 后，将检测结果进行显示和保存。记录不同浓度的  $\beta$ -内酰胺酶标准溶液所对应的光信号值，制作标准曲线。

(6) 样品的检测

取一定量的待测样品滴加到传感器敏感膜上，再将传感器插入到系统接口中，按下测试键，响应一段时间，待数据稳定后，记录并保存测得信号值，对照  $\beta$ -内酰胺酶标准曲线，得出样品中  $\beta$ -内酰胺酶的含量。

2. 如权利要求 3 所述的一种利用光纤生物传感器快速检测乳制品中  $\beta$ -内酰胺酶的方法，其中所述的包被液为 0.02 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和 0.04 mol/L 的  $\text{NaHCO}_3$ ，pH 值为 9.6。

3. 如权利要求 3 所述的一种利用光纤生物传感器快速检测乳制品中  $\beta$ -内酰胺酶的方法，其中所述的稀释液为 0.5% 的干酪素和 0.01 mol/L 的 PBS，pH 值为 9.6。

4. 如权利要求 3 所述的一种利用光纤生物传感器快速检测乳制品中  $\beta$ -内酰胺酶的方法，其

---

中所述的清洗液为 0.02 mol/L 磷酸盐, 0.05%的 TritonX-100 和 0.1 g/L 的  $\text{NaN}_3$ , pH 值为 7.2。

5. 一种利用光纤生物传感器快速检测乳制品中  $\beta$ -内酰胺酶的方法, 其特征在于其包括光学系统、电子学系统、数据采集系统及控制与处理系统, 其特征在于其还包括光纤和传感器。
6. 根据权利要求书 5 所述的光纤材料为聚苯乙烯。

---

一种利用光纤生物传感器快速检测乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶的方法

### 技术领域

本发明涉及一种利用光纤生物传感器快速检测乳制品 $\beta$ -内酰胺酶的方法，属于生物技术领域。

### 背景技术

“解抗剂”学名 $\beta$ -内酰胺酶，它是针对 $\beta$ -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，它能有效分解牛奶中残留的抗生素。 $\beta$ -内酰胺酶为我国不允许使用的食品添加剂，该酶的使用掩盖了牛奶中实际含有的抗生素。但是为了追求利益，一些商贩使用它来降解掉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，同时它也能够使青霉素内酰胺结构破坏而失去活性，导致青霉素、头孢菌素等抗生素类药物耐药性增高，从而大大降低了人们抵抗传染病的能力，给消费者的身体健康带来危害。因此，迫切需要快速的检测方法，从而能准确的检测乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶。

目前，国内常用的牛奶中的抗生素检测主要依据 GB 方法进行，此方法操作比较简便，比较适合基层单位使用，但是存在着灵敏度较低、操作误差较大等问题，比如：TTC 显色时间的掌握和目测、菌种的保存和接种量等。也有相关机构采用产生头孢素法来检测牛奶中的 $\beta$ -内酰胺酶，这种方法灵敏度相对较高，但是能够检测的 $\beta$ -内酰胺酶类别比较少，实用性较差。

生物传感器是以生物化学和传感技术为基础，用酶、抗体、细胞等生物活性物质作为分子识别元件，配上信号转换器和电子测量仪所构成的分析工具。生物传感器具有准确、灵敏、易操作和可重复使用等优点。其中光纤传感器是一种光电转换设备，抗腐蚀、抗电磁辐射和电子频率干扰，同时光纤低衰减率的高质量传输可实现对危险地区的远距离检测。由于光纤传感器的上述特点，其在食品安全检测控制领域的应用有着广阔的前景。

利用生物传感器，特别是光纤生物传感器检测乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶的方法，还未见有此类专利报道。本发明专利利用生物传感器技术建立了一种快速检测乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶方法。

### 发明内容

本发明的目的在于提供一种用于检测 $\beta$ -内酰胺酶的光纤生物传感器。该传感器是由光学系统、电子学系统、数据采集系统及控制与处理系统组成。所用的光纤材料为聚苯乙烯。

本发明的另一个目的在于提供一种利用光纤生物传感器检测 $\beta$ -内酰胺酶的方法，其检测原理为：

在光纤表面加上载有 $\beta$ -内酰胺酶抗体的生物敏感元件，当倏逝波穿过生物敏感元件时，或产生光信号，或导致倏逝波与光纤内传播光线的强度、相位或频率的改变，而测量这些变化，即可获得生物敏感元件上变化的信息。

本发明所述的一种利用光纤生物传感器检测 $\beta$ -内酰胺酶的方法，具体包括以下步骤：

所述的 $\beta$ -内酰胺酶抗体制备：取 $\beta$ -内酰胺酶100  $\mu\text{g}$ 、卡介苗5 mg，与等体积佛氏完全佐剂研磨后注入6周龄雌性BALBPC小鼠腹腔，以后采用佛氏不完全佐剂，隔周腹腔注射5次，融合前3天腹腔注射50  $\mu\text{g}$   $\beta$ -内酰胺酶标准溶液，以50% PEG4000为融合剂，将小鼠脾细胞与NS1细胞融合，IMDM2HAT选择培养，2周后换HT培养液培养。以 $\beta$ -内酰胺酶为抗原，经间接ELISA法筛选阳性克隆后的杂交瘤细胞，所得细胞株继续扩增培养。将阳性细胞株注入BALBPC小鼠腹腔，诱生腹水，用兔抗鼠免疫球蛋白及琼脂双扩散法检测 $\beta$ -内酰胺酶抗体；

所述的抗体包被液为0.02 mol/L的 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 和0.04 mol/L的 $\text{NaHCO}_3$ 溶液，pH值为9.6；

所述的稀释液为0.5%的干酪素和0.01 mol/L的PBS，pH值为9.6；

所述的清洗液为0.02 mol/L磷酸盐，0.05%的TritonX-100和0.1 g/L的 $\text{NaN}_3$ ，pH值为7.2；

所述 $\beta$ -内酰胺酶标准溶液的配制：取一定量的 $\beta$ -内酰胺酶，配制为浓度分别为0、5、10、50、100和200  $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准溶液；

所述包被抗体的制备：用包被液将 $\beta$ -内酰胺酶抗体稀释至一定浓度并装入毛细管中，将光纤插入4 $^\circ\text{C}$ 孵育12~16 h，然后可用于相应的免疫反应。暂时不用时可置4 $^\circ\text{C}$ 保存；

所述标记抗体的制备：将所测标本的抗体用稀释液稀释到一定浓度，在碱性环境下与荧光素染料Cy5结合后，通过凝胶过滤分离到标记了Cy5的单克隆抗体。

所述抗体固定的制作：通过三氨基丙基三乙基硅烷等硅烷类物质将光纤表面硅烷化，然后借助双功能交联剂戊二醛将标记了Cy5的 $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体进行固定。

所述标准曲线的制作：将标记了Cy5的 $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体固定到活化器上，放入光纤生物传感器，取一定量的不同浓度的 $\beta$ -内酰胺酶标准溶液滴加到传感器敏感膜上，再将传感器插入到系统接口中，按下测试键，响应一段时间，约300 s后，将检测结果进行显示和保存。记录不同浓度的 $\beta$ -内酰胺酶标准溶液所对应的光信号值，制作标准曲线。

所述乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶的检测方法：进行测试时，可直接将经过适当预处理的样品放入光纤生物传感器进行测试，根据所测得的光信号，对照标准曲线，即可求出样品中 $\beta$ -内酰胺酶的浓度。

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光纤生物传感器，可用于检测乳制品中的 $\beta$ -内酰胺酶；
- (2) 抗原-抗体特异性结合决定了该光纤生物传感器的高灵敏度，不受其他干扰，降低了

检出下限，且该光纤传感器具有抗电磁辐射、抗电子频率干扰、抗腐蚀等优点；

(3) 体积小，方便携带，且所需检测样品少；

(4) 使用荧光取代了放射性物质，响应时间快，易于操作和成本低廉。

### 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

##### $\beta$ -内酰胺酶抗体制备

取 $\beta$ -内酰胺酶100  $\mu$ g、卡介苗5 mg，与等体积佛氏完全佐剂研磨后注入6周龄雌性BALBPC小鼠腹腔，以后采用佛氏不完全佐剂，隔周腹腔注射5次，融合前3天腹腔注射50  $\mu$ g  $\beta$ -内酰胺酶标准溶液，以50% PEG4000为融合剂，将小鼠脾细胞与NS1细胞融合，IMDM2HAT选择培养，2周后换HT培养液培养。以 $\beta$ -内酰胺酶为抗原，经间接ELISA法筛选阳性克隆后的杂交瘤细胞，所得细胞株继续扩增培养。将阳性细胞株注入BALBPC小鼠腹腔，诱生腹水，用兔抗鼠免疫球蛋白及琼脂双扩散法检测 $\beta$ -内酰胺酶抗体，制备 $\beta$ -内酰胺酶抗体。

#### 实施例2

##### (1) 包被抗体的制备

用包被液将 $\beta$ -内酰胺酶抗体稀释至一定浓度并装入毛细管中，将光纤插入4 $^{\circ}$ C孵育12~16 h，然后可用于相应的免疫反应。暂时不用时可置4 $^{\circ}$ C保存。

##### (2) 标记抗体的制备

将所测标本的抗体用稀释液稀释到一定浓度，在碱性环境下与荧光素染料Cy5结合后，通过凝胶过滤分离到标记了Cy5的单克隆抗体。

##### (3) 抗体固定的制作

通过三氨基丙基三乙基硅烷等硅烷类物质将光纤表面硅烷化，然后借助双功能交联剂戊二醛将标记了Cy5的 $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体进行固定。

##### (4) 具体实施方式

将标记了Cy5的 $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体固定到活化器上，放入光纤生物传感器，检测时，取一定量预处理好的样品或 $\beta$ -内酰胺酶标准溶液滴加到传感器敏感膜上，再将传感器插入到系统接口中，按下测试键，响应一段时间后，将检测结果进行显示和保存。记录不同样品溶液所对应的光信号值。

#### 实施例3

##### (1) 标准曲线的制作

取一定量的不同浓度的 $\beta$ -内酰胺酶标准溶液滴加到传感器敏感膜上，再将传感器插入到

系统接口中，按下测试键，响应一段时间，约300 s后，将检测结果进行显示和保存。记录不同浓度的 $\beta$ -内酰胺酶标准溶液所对应的光信号值，制作标准曲线。

## (2) 样品的预处理及检测

称取不含 $\beta$ -内酰胺酶的奶粉 1 g，加入 5 倍体积 DMSO 振荡 1 h，离心取上清液 2  $\mu$ l。向上述清液中添加终浓度为 50  $\mu$ g/L 的 $\beta$ -内酰胺酶，稀释 10 倍作为检测对照样品，利用光纤生物传感器进行测试。

取 20  $\mu$ l 的样品，滴加到光纤传感器的敏感膜上，再将传感器插入到系统接口中，按下测试键，响应一段时间，等待数据稳定，约 300 s 后，读取所测计算机所显示的信号的强度，对照所作的 $\beta$ -内酰胺酶标准曲线，求得样品溶液 $\beta$ -内酰胺酶的含量，乘以样品稀释倍数 10 倍，得出所测样品中 $\beta$ -内酰胺酶的含量。

专利名称(译)	一种利用光纤生物传感器快速检测乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101625365A</a>	公开(公告)日	2010-01-13
申请号	CN200910184029.9	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 杨婷婷 蔡建荣 马祯婉		
发明人	张建中 赵晓联 赵春城 徐祖奇 杨婷婷 蔡建荣 马祯婉		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/544 G01N33/532 G01N21/64 C12N15/06 C12P21/08		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种利用光纤生物传感器快速检测乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶的方法，涉及一种光纤生物传感器，其包括光学系统、电子学系统、数据采集系统及控制与处理系统，其还包括光纤和传感器，其中光纤材料为聚苯乙烯，传感器上设有敏感膜，敏感膜上含有利用戊二醛固定的Cy5标记的 $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体。该单克隆抗体通过以 $\beta$ -内酰胺酶为抗原免疫小鼠，细胞融合等过程制备。本发明具有高灵敏度、抗电磁辐射、抗电子频率干扰、抗腐蚀性，且仪器体积小，方便携带，所需检测样品少，响应时间快，易于操作和成本低廉等优点。可广泛用于液态牛奶、奶粉、固体样品等乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶的检测。