



(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 20888256 U

(45)授权公告日 2019.05.21

(21)申请号 201820620266.X

(22)申请日 2018.04.27

(73)专利权人 北京纳百生物科技有限公司

地址 101111 北京市通州区科创十四街11
号院3号楼

(72)发明人 于在江 郭秀锋 邵宗洋 刘彩娟

(74)专利代理机构 北京知呱呱知识产权代理有
限公司 11577

代理人 李芙蓉 孙进华

(51) Int. Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

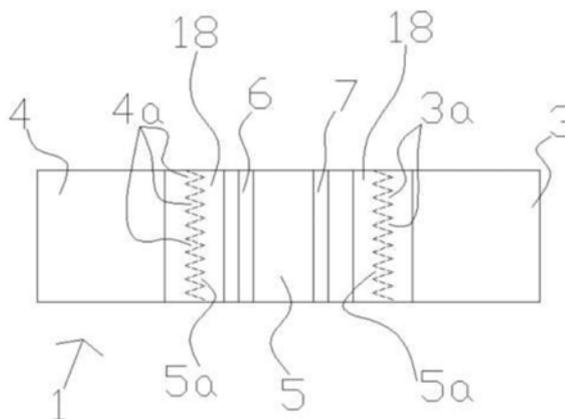
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)实用新型名称

一种检测β-内酰胺酶的胶体金试纸条组件

(57)摘要

本实用新型公开了一种检测β-内酰胺酶的胶体金试纸条组件,涉及食品安全免疫检测技术领域,它包括微孔板架、箱体、多个胶体金试纸、多个微孔试剂、多个塑料桶和多个一次性塑料吸管。本实用新型对利用免疫检测技术进行β-内酰胺酶检测提供了具体器具,检测灵敏、速度快、操作简便,检测成本低廉,无需特殊仪器设备,非常适合于基层实验室和养殖场等场合检测应用,有助于从生产一线控制乳品质量,提高生产效率。



1. 一种检测 β -内酰胺酶的胶体金试纸条组件,其特征在于:它包括微孔板架(10)、盒体(13)、多个胶体金试纸(1)、多个微孔试剂(8)、多个塑料桶(14)和多个一次性塑料吸管;

所述胶体金试纸(1)包括PVC背板(2),在PVC背板(2)的顶面左端附着有样品垫(4),且样品垫(4)的右端边沿为样品垫锯齿(4a),在PVC背板(2)的顶面右端附着有吸水垫(3),且吸水垫(3)的左端边沿为吸水垫锯齿(3a),在样品垫(4)与吸水垫(3)之间的PVC背板(2)顶面上还设置有硝酸纤维素膜(5),且硝酸纤维素膜(5)的左右两端均具有硝酸纤维素膜锯齿(5a),所述硝酸纤维素膜(5)左端的硝酸纤维素膜锯齿(5a)与样品垫锯齿(4a)交错对接并在对接位置上表面附着有固定垫(18),硝酸纤维素膜(5)右端的硝酸纤维素膜锯齿(5a)与吸水垫锯齿(3a)交错对接并在对接位置上表面附着有固定垫(18),在所述硝酸纤维素膜(5)上由左至右间隔喷涂有检测线(6)和质控线(7),且在检测线(6)上喷涂有 β -内酰胺酶多克隆抗体,在质控线(7)上喷涂有羊抗鼠IgG抗体;

所述微孔试剂(8)包括包被有胶体金标记内酰胺酶单克隆抗体的塑料微孔(8a),在塑料微孔(8a)的顶端敞口端通过塑料孔盖帽(9)进行密封,且八个塑料微孔(8a)依次连接形成一组微孔试剂(8);

所述盒体(13)为长方形壳体,盒体(13)的顶端敞口处设置有与盒体(13)一侧连接的扣盖,在盒体(13)的内部放置有纸托(11),在所述纸托(11)上开设有多个孔位(12);

每个塑料桶(14)内放置有一组微孔试剂(8)和八个胶体金试纸(1),且每个塑料桶(14)放置在盒体(13)中纸托(11)上相应的孔位(12)内;

所述包被有胶体金标记内酰胺酶单克隆抗体的塑料微孔(8a)为包被有青霉素酶特异性单克隆抗体的塑料微孔(8a)。

2. 根据权利要求1所述的一种检测 β -内酰胺酶的胶体金试纸条组件,其特征在于:所述塑料桶(14)的个数为十二个,所述纸托(11)上开设有的孔位(12)的个数为十二个。

3. 根据权利要求1所述的一种检测 β -内酰胺酶的胶体金试纸条组件,其特征在于:所述胶体金试纸(1)的整体长度为7cm,胶体金试纸(1)的整体宽度为4cm;检测线(6)的和质控线(7)的整体宽度均为2mm。

4. 根据权利要求1所述的一种检测 β -内酰胺酶的胶体金试纸条组件,其特征在于:所述微孔板架(10)为96孔塑料板架。

5. 根据权利要求1所述的一种检测 β -内酰胺酶的胶体金试纸条组件,其特征在于:所述一次性塑料吸管为0.2mL的一次性巴士吸管。

一种检测 β -内酰胺酶的胶体金试纸条组件

技术领域

[0001] 本实用新型涉及食品安全免疫检测技术领域,具体涉及一种检测 β -内酰胺酶的胶体金试纸条组件。

背景技术

[0002] β -内酰胺类抗生素(β -lactams)系指化学结构中具有 β -内酰胺环的一大类抗生素,包括临床最常用的青霉素与头孢菌素,以及新发展的头霉素类、硫霉素类、单环 β -内酰胺类等其他非典型 β -内酰胺类抗生素。此类抗生素具有杀菌活性强、毒性低、适应症广及临床疗效好的优点,因此在动物养殖中大量应用。各种 β -内酰胺类抗生素的作用机制均相似,都能抑制胞壁粘肽合成酶,即青霉素结合蛋白(penicillin binding proteins,PBPs),从而阻碍细胞壁粘肽合成,使细菌胞壁缺损,菌体膨胀裂解。由于长期药物压力,细菌也出现了不同程度的耐药性,其主要是通过自身产生 β -内酰胺酶来水解 β -内酰胺环,从而使此类药物失去药效。

[0003] 由于 β -内酰胺酶的水解作用较强,在农产品特别是牛乳交易中,常被不法商贩使用来消除乳中的此类抗生素残留,从而人造“无抗奶”。2005年2014年期间,已有数家公司公开宣称出售分解牛乳中残留抗生素的解抗剂。 β -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,给使用乳及乳制品的消费者带来潜在健康风险。为此,我国卫生部于2011年在《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂名单》明确将 β -内酰胺酶列入黑名单,严禁在乳和乳制品中违法添加。

[0004] 目前乳及乳制品中 β -内酰胺酶常用的检测方法有杯碟法、直接法、间接法、碘量法等,其中杯碟法利用微生物生长受到抗生素抑制的原理来检测是否有酶的存在;直接法是通过液相色谱来检测青霉素水解代谢物间青霉噻唑酸来确定是否有酶存在;间接法利用 β -内酰胺酶能够酶解青霉素的原理,向牛奶中添加一定量的青霉素,如果牛奶中存在一定浓度的 β -内酰胺酶,那么青霉素经 β -内酰胺酶水解后浓度会减少,再通过高效液相法检测青霉素的含量来确定酶的含量;碘量法 β -内酰胺酶分解青霉素后产生的青霉噻唑酸与淀粉竞争游离碘,破坏了碘与淀粉的蓝色复合物,使蓝色变为无色,从而判断牛奶中是否掺有抗生素分解酶。这几种方法中碘量法成本最低,但灵敏度较差、杯碟法可靠但操作繁琐、间接法和直接法均需要利用液相色谱技术来定量,操作更为繁琐,且成本高。

[0005] 综上所述,在实际检测中,往往利用免疫检测技术来进行检测,通过免疫检测检测乳中青霉素含量来确定其中是否有 β -内酰胺酶的存在,其原理与间接法近似,其操作需要向乳中添加一定的青霉素,检测时间一般为10-30min,由于缺乏相应的检测器具,加之操作过程中对精度要求较高,一不小心就出现假阴性、假阳性结果。故亟需一种利用免疫检测技术来进行 β -内酰胺酶检测的器具。

实用新型内容

[0006] 本实用新型的目的在于提供一种检测 β -内酰胺酶的胶体金试纸条组件,用以解决

在实际检测中,利用免疫检测技术来进行检测时,由于缺乏相应的检测器具,加之操作过程中对精度要求较高,一不小心就出现假阴性、假阳性结果。故亟需一种利用免疫检测技术来进行 β -内酰胺酶检测的器具的问题。

[0007] 为实现上述目的,本实用新型的技术方案为一种检测 β -内酰胺酶的胶体金试纸条组件,它包括微孔板架、箱体、多个胶体金试纸、多个微孔试剂、多个塑料桶和多个一次性塑料吸管;

[0008] 所述胶体金试纸包括PVC背板,在PVC背板的顶面左端附着有样品垫,且样品垫的右端边沿为样品垫锯齿,在PVC背板的顶面右端附着有吸水垫,且吸水垫的左端边沿为吸水垫锯齿,在样品垫与吸水垫之间的PVC背板顶面上还设置有硝酸纤维素膜,且硝酸纤维素膜的左右两端均具有硝酸纤维素膜锯齿,所述硝酸纤维素膜左端的硝酸纤维素膜锯齿与样品垫锯齿交错对接并在对接位置上表面附着有固定垫,硝酸纤维素膜右端的硝酸纤维素膜锯齿与吸水垫锯齿交错对接并在对接位置上表面附着有固定垫,在所述硝酸纤维素膜上由左至右间隔喷涂有检测线和质控线,且在检测线上喷涂有 β -内酰胺酶多克隆抗体,在质控线上喷涂有羊抗鼠IgG抗体;

[0009] 所述微孔试剂包括包被有胶体金标记内酰胺酶单克隆抗体的塑料微孔,在塑料微孔的顶端敞口端通过塑料孔盖帽进行密封,且八个塑料微孔依次连接形成一组微孔试剂;

[0010] 所述箱体为长方形壳体,箱体的顶端敞口处设置有与箱体一侧连接的扣盖,在箱体的内部放置有纸托,在所述纸托上开设有多个孔位;

[0011] 每个塑料桶内放置有一组微孔试剂和八个胶体金试纸,且每个塑料桶放置在箱体中纸托上相应的孔位内。

[0012] 优选的,所述塑料桶的个数为十二个,所述纸托上开设有的孔位的个数为十二个。

[0013] 优选的,所述胶体金试纸的整体长度为7cm,胶体金试纸的整体宽度为4cm;检测线的和质控线的整体宽度均为2mm。

[0014] 优选的,所述微孔板架为96孔塑料板架。

[0015] 优选的,所述一次性塑料吸管为0.2mL的一次性巴士吸管。

[0016] 优选的,所述包被有胶体金标记内酰胺酶单克隆抗体的塑料微孔为包被有青霉素酶特异性单克隆抗体的塑料微孔。

[0017] 本实用新型具有如下优点:

[0018] 本实用新型对利用免疫检测技术进行 β -内酰胺酶检测提供了具体器具,通过设置喷涂有 β -内酰胺酶多克隆抗体的检测线上,以及喷涂有羊抗鼠IgG抗体的质控线配合检测,与传统仪器方法和国家标准方法相比较,具有:一、检测灵敏、速度快、操作简便,单个样本检测时间为10min,检测灵敏度满足国家标准要求。并且操作简便,一般的奶站工人无需培训即可上手操作。二、检测成本低廉,单个样本检测成本不超过10元,是传统间接法和直接法仪器检测方法的十分之一,甚至更少,可以给检测单位节省大量成本。三、无需特殊仪器设备,非常适合于基层实验室和养殖场等场合检测应用,有助于从生产一线控制乳品质量,提高生产效率。

附图说明

[0019] 图1为本实用新型中胶体金试纸的主视结构示意图;

- [0020] 图2为本实用新型中胶体金试纸的俯视结构示意图；
[0021] 图3为微孔试剂的结构示意图；
[0022] 图4是塑料桶的结构示意图；
[0023] 图5为微孔板架的结构示意图；
[0024] 图6为盒体及纸托的结构示意图。

具体实施方式

[0025] 以下实施例用于说明本实用新型，但不用来限制本实用新型的范围。

[0026] 实施例1

[0027] 这里需要说明的是，所述方位词左、右、上、下均是以图1所示的视图为基准定义的，应当理解，所述方位词的使用不应限制本申请所请求的保护范围。

[0028] 下面结合附图和实施例对本发明进一步说明。

[0029] 如图1至图6所示，一种检测 β -内酰胺酶的胶体金试纸条组件，它包括微孔板架10、盒体13、多个胶体金试纸1、多个微孔试剂8、多个塑料桶14和多个一次性塑料吸管；

[0030] 所述胶体金试纸1包括PVC背板2，在PVC背板2的顶面左端附着有样品垫4，且样品垫4的右端边沿为样品垫锯齿4a，在PVC背板2的顶面右端附着有吸水垫3，且吸水垫3的左端边沿为吸水垫锯齿3a，在样品垫4与吸水垫3之间的PVC背板2顶面上还设置有硝酸纤维素膜5，且硝酸纤维素膜5的左右两端均具有硝酸纤维素膜锯齿5a，所述硝酸纤维素膜5左端的硝酸纤维素膜锯齿5a与样品垫锯齿4a交错对接并在对接位置上表面附着有固定垫18，硝酸纤维素膜5右端的硝酸纤维素膜锯齿5a与吸水垫锯齿3a交错对接并在对接位置上表面附着有固定垫18，在所述硝酸纤维素膜5上由左至右间隔喷涂有检测线6和质控线7，且在检测线6上喷涂有 β -内酰胺酶多克隆抗体，在质控线7上喷涂有羊抗鼠IgG抗体；

[0031] 所述微孔试剂8包括包被有胶体金标记内酰胺酶单克隆抗体的塑料微孔8a，在塑料微孔8a的顶端敞口端通过塑料孔盖帽9进行密封，且八个塑料微孔8a依次连接形成一组微孔试剂8；

[0032] 所述盒体13为长方形壳体，盒体13的顶端敞口处设置有与盒体13一侧连接的扣盖，在盒体13的内部放置有纸托11，在所述纸托11上开设有多个孔位12；

[0033] 每个塑料桶14内放置有一组微孔试剂8和八个胶体金试纸1，且每个塑料桶14放置在盒体13中纸托11上相应的孔位12内。

[0034] 本实用新型的组装方法为：

[0035] 一、内酰胺酶微孔试剂的准备：

[0036] (一) 内酰胺酶单克隆抗体的制备与筛选：

[0037] 将从中国食品药品检定研究院采购的青霉素酶标准品(货号：130441，2mL/支，10支/盒)稀释至一定量免疫Balb/C小鼠，免疫剂量为50 μ g每次，首次免疫时与等量弗氏完全佐剂乳化混匀，后续免疫与弗氏不完全佐剂乳化混匀。免疫方式为皮下多点注射。5次免疫后采血测定效价，然后以100 μ g前述免疫原加强免疫，按照常规方法进行细胞融合，以青霉素酶标准品为标准品筛选特异性单克隆抗体。挑选抗体灵敏度高接近于0.5U/mL的单抗细胞株用于后续试纸条生产。

[0038] (二) 内酰胺酶单克隆抗体的纯化；

[0039] 采用体内诱生法制备内酰胺酶腹水单抗,收集腹水后以饱和硫酸铵沉淀法纯化腹水抗体,具体操作参考文献进行。粗纯的腹水抗体继续以Protein G亲和层析柱纯化,具体操作参考亲和柱操作说明书进行,此处不再赘述。亲和纯化获得高纯度的内酰胺酶单克隆抗体即可直接用于胶体金标记。

[0040] (三) 胶体金的制备:

[0041] 取0.01%氯金酸水溶液100ml用恒温电磁搅拌器加热至沸腾,持续搅拌的情况下加入1%柠檬酸三钠水溶液2.5ml,继续搅拌加热20min,溶液呈透亮的红色。室温冷却,用去离子水恢复到原体积,4℃保存。

[0042] (四) 胶体金颗粒标记单抗的制备:

[0043] 取制备好的胶体金颗粒溶液,用0.1mol/L K_2CO_3 或0.1mol/L HCl调节胶体金溶液的pH值为8.2。置于磁力搅拌器上,然后将纯化后的内酰胺酶单克隆抗体以PBS按照1:2500的比例稀释后加入胶体金溶液中搅拌反应60分钟,然后将PEG20000溶液加入混合反应液中,使PEG的最终浓度约为1%,置于在4℃和条件下冷冻离心机上慢速,所述上慢速为11000~13000rpm,通过上慢速离心10分钟后弃去上清液。

[0044] 将下层沉淀用PBS反复洗涤并继续离心弃去多余上清液,最后将沉淀物以PBS缓冲液重悬,使最终的蛋白浓度约为25~50 μ g/mL左右。

[0045] 制备好的金标抗体按照100 μ L的量分装于96孔酶标板孔中,冷冻干燥,然后以酶标板孔盖帽密封,此时, β -内酰胺酶试纸条所用的微孔试剂制备完毕。制备好的微孔试剂置于4℃保存备用。

[0046] 二、内酰胺酶检测线、质控线溶液的准备:

[0047] (一) 内酰胺酶多克隆抗体的制备

[0048] 将青霉素酶标准品稀释至一定量免疫新西兰大耳兔,免疫剂量为100 μ g/kg体重/次,首次免疫时与等量弗氏完全佐剂乳化混匀,后续免疫与弗氏不完全佐剂乳化混匀。免疫方式为皮下多点注射。5次免疫后采血测定效价,待效价达到1:10000,且OD>2.0时采血,纯化血清获得兔抗内酰胺酶多克隆抗体。纯化方式为饱和硫酸铵沉淀法。

[0049] (二) 检测线和质控线的制备

[0050] 将兔抗内酰胺酶多克隆抗体以PBS稀释至25 μ g/mL备用。

[0051] 将商品化的羊抗鼠二抗以PBS稀释至180 μ g/mL备用。

[0052] 三、胶体金试纸的组装:

[0053] 用Biodot划膜仪在硝酸纤维素膜5上喷涂出两条线,检测线6和质控线7,包被量分别为1.0 μ L/cm²和1.0 μ L/cm²;将喷涂好的硝酸纤维素膜5置于37℃干燥2h;然后将硝酸纤维素膜5粘贴在PVC背板2上,同时在PVC背板2靠近质控线7的一段粘贴上吸水垫3、在另一端粘贴上样品垫4。将粘贴好的大板用切条机切成宽度为4mm的单条。挑选其中吸水垫、样品垫完整,且质控线、检测线无损坏的作为备用。

[0054] 四、胶体金检测试剂盒,即盒体3的组装:

[0055] 将一组微孔试剂8和八个胶体金试纸1装在含有干燥剂的塑料桶14中,贴好标签;十二个塑料桶14装在盒体13中纸托11的相应孔位12上,然后贴好外标签,塑封后放置于2-8℃保存。

[0056] 本实用新型检测 β -内酰胺酶的胶体金试纸条组件,以最常见的中国食品药品检定

研究院研制的 β -内酰胺酶为直接检测目标,在盒体13内一并放入产品操作说明书、质控报告等,形成完整的检测试剂盒。

[0057] 检测操作时的具体使用方法如下:(一)准备样本和胶体金试纸1:将牛奶样本和试纸条包装盒从冷藏环境中取出,置于室温30min以上,使其充分回温。

[0058] (二)打开试纸条包装盒,即盒体13,根据检测样本的数量取相应数量的胶体金试纸1、微孔试剂8、一次性塑料吸管和微孔板架10。

[0059] (三)根据需要剪下相应数量的塑料微孔8a使用,将准备好的微孔试剂8取下塑料孔盖帽9,放置在微孔板架10上,用一次性塑料吸管吸取0.2mL牛奶样本加入相应的塑料微孔8a内,上下吸打三次,使得牛奶样本与塑料微孔8a内冷冻干燥的胶体金标记的内酰胺酶单克隆抗体充分混合,然后室温静置5min;

[0060] (四)取出胶体金试纸1,将样品垫4端插入塑料微孔8a内混匀的牛奶样本中,开始计时5min,完毕,根据试纸条说明书判断检测结果。

[0061] (五)如果检测线6比质控线7的颜色浅或者不显色,则为阳性,如果检测线6比质控线7的颜色深,则为阴性。如果质控线7不显色,则结果作废,需要更换胶体金试纸1重新检测。

[0062] 通过在样品垫4上设置样品垫锯齿4a并与硝酸纤维素膜5左端的硝酸纤维素膜锯齿5a对接,在吸水垫3上设置吸水垫锯齿3a并与硝酸纤维素膜5右端的硝酸纤维素膜锯齿5a对接,起到增强固定的作用,防止在使用的过程中样品垫4、硝酸纤维素膜5和吸水垫3相互发生窜动偏移,进而确保检测的准确性。同时,在其对接处设置固定垫18,固定垫18可为黏性胶带,将样品垫4与硝酸纤维素膜5、硝酸纤维素膜5与吸水垫3进行进一步稳固,另一方面,在样品垫4插入样本中时,样品垫4与硝酸纤维素膜5处的固定垫18可以起到阻隔截流作用,防止样本过盛发生冲样现象。

[0063] 实施例2

[0064] 在上述技术方案基础上,所述塑料桶14的个数为十二个,所述纸托11上开设有的孔位12的个数为十二个。如此设置,配备数量充足,满足实际需要。

[0065] 实施例3

[0066] 在上述技术方案基础上,所述胶体金试纸1的整体长度为7cm,胶体金试纸1的整体宽度为4cm;检测线6的和质控线7的整体宽度均为2mm。如此设置,体积小,满足实际需要。

[0067] 实施例4

[0068] 在上述技术方案基础上,所述微孔板架10为96孔塑料板架。如此设置,塑料板架工作性能稳定,用于提供检测反应的支撑载体,满足实际需要。

[0069] 实施例5

[0070] 在上述技术方案基础上,所述一次性塑料吸管为0.2mL的一次性巴士吸管。如此设置,工作性能稳定,使用方便,满足实际需要。

[0071] 实施例6

[0072] 在上述技术方案基础上,所述包被有胶体金标记内酰胺酶单克隆抗体的塑料微孔8a为包被有青霉素酶特异性单克隆抗体的塑料微孔8a。如此设置,水解效果好,提高检测精度,满足实际需要。

[0073] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施例对本实用新型作了详尽的描述,但在本实用新型基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本实用新型精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本实用新型要求保护的范围。

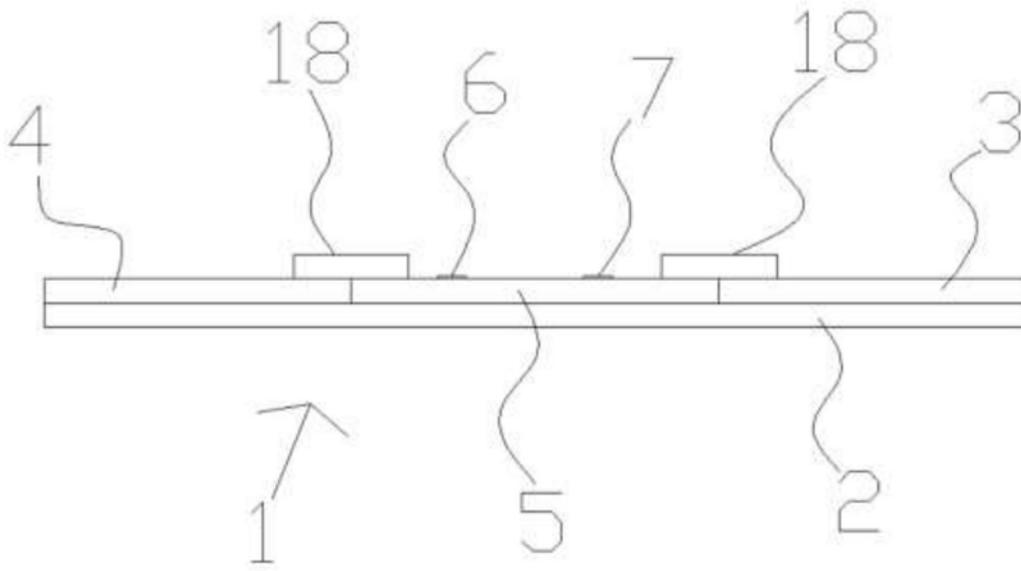


图1

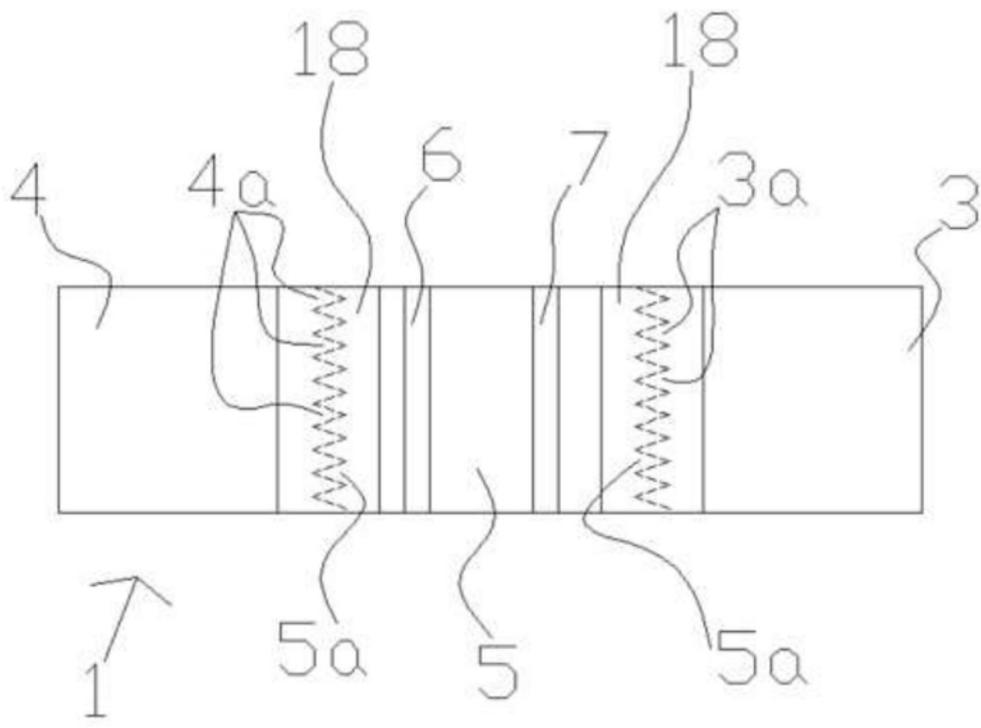


图2

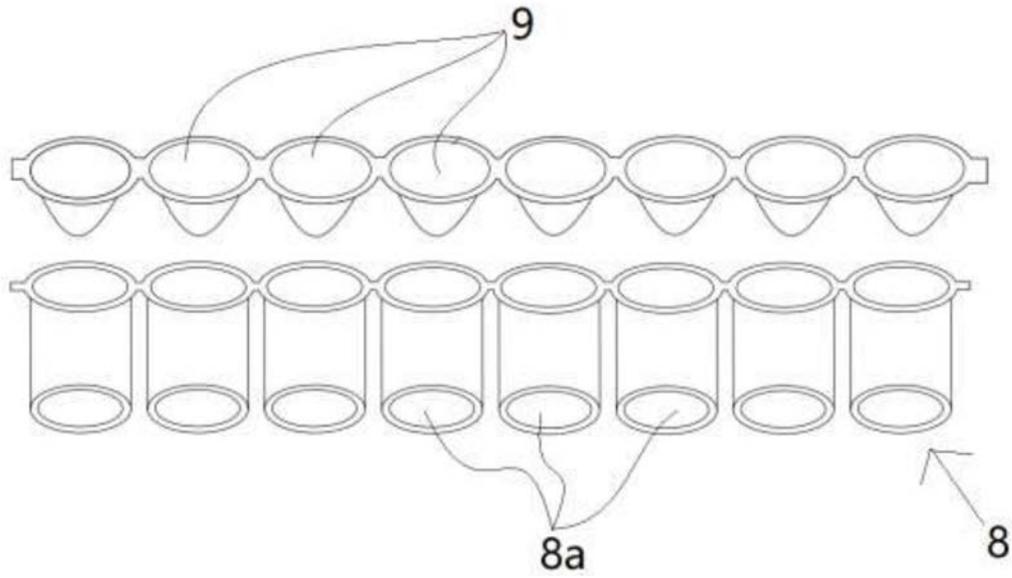


图3

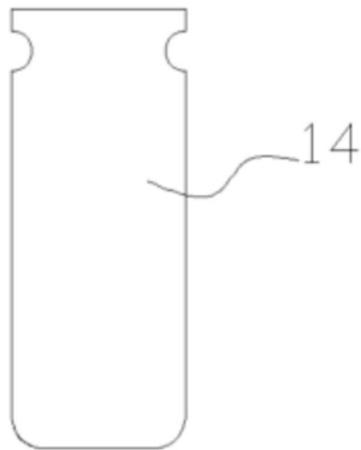


图4

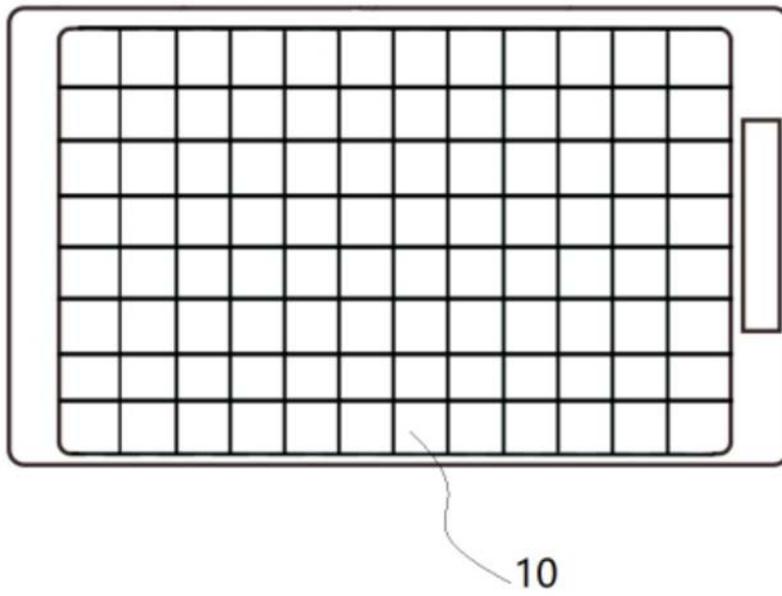


图5

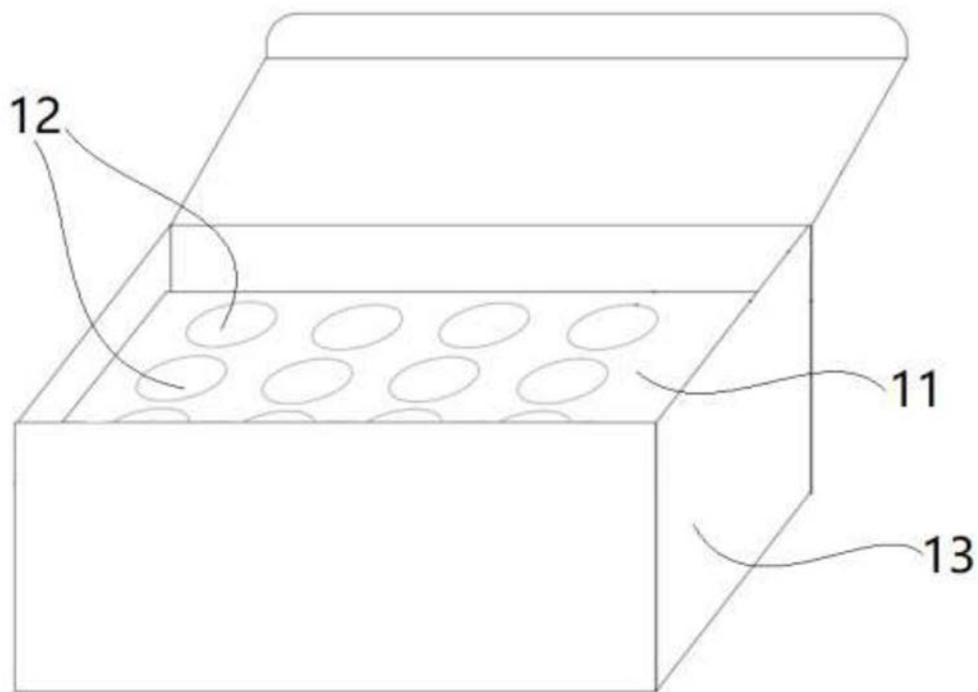


图6

专利名称(译)	一种检测β-内酰胺酶的胶体金试纸条组件		
公开(公告)号	CN208888256U	公开(公告)日	2019-05-21
申请号	CN201820620266.X	申请日	2018-04-27
[标]发明人	于在江 郭秀锋 邵宗洋 刘彩娟		
发明人	于在江 郭秀锋 邵宗洋 刘彩娟		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/543 G01N33/531		
代理人(译)	孙进华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型公开了一种检测β-内酰胺酶的胶体金试纸条组件，涉及食品安全免疫检测技术领域，它包括微孔板架、盒体、多个胶体金试纸、多个微孔试剂、多个塑料桶和多个一次性塑料吸管。本实用新型对利用免疫检测技术进行β-内酰胺酶检测提供了具体器具，检测灵敏、速度快、操作简便，检测成本低廉，无需特殊仪器设备，非常适合于基层实验室和养殖场等场合检测应用，有助于从生产一线控制乳品质量，提高生产效率。

