

方法未检出。

纳米免疫磁珠不仅可以富集目标菌体,亦可有效地去除抑制剂成分,如食物残渣中的有机物、酚类化合物、脂肪、糖原或微生物代谢产物,可致LAMP和RT-PCR检测灵敏度降低甚至反应完全失败,因此必须通过富集和纯化对样品进行前处理<sup>[10]</sup>。免疫磁珠分离技术可以解决以上问题。但IMS技术作为一种较新的免疫学技术,其本身也存在一些较难克服的问题。首先是免疫磁珠本身的质量,特别是对于单克隆抗体包被的磁珠,由于单抗效价批次间易出现波动,可直接影响免疫磁珠对目标菌的捕获率。其次是在不同的标本性状及杂菌污染程度下,免疫磁珠和目标微生物相互作用会受到影响,会降低该技术的灵敏度和特异性。如杂菌污染较多的牛肉类制品,并不适用于IMS技术的检测<sup>[11-13]</sup>。本研究将纳米免疫磁珠与LAMP检测方法结合,建立以免疫磁分离为前处理步骤的快速检测方法,由以上结果得出:Nano-IMB-VP可以高效、特异性富集副溶血性弧菌,本研究所建立的Nano-IMS-LAMP方法缩短了检测时间,在实际检测工作中具有良好的应用前景。

## 参考文献

- [1] 张俊彦,梅玲玲,朱敏,等. 301份海水产品副溶血弧菌定量检测分析[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(3):509-510.
- [2] 张隽娴,郭爱玲,郑华英. 市水产品副溶血弧菌污染状况的调查[J]. 中国卫生检验杂志,2011,21(3):718-719.
- [3] 张淑红,申志新,关文英,等. 河北省沿海地区海产品副溶血

弧菌污染状况调查分析[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(3):333-334.

- [4] A Manti, T Falcioni, R Campana. Detection of environmental *Vibrio parahaemolyticus* using a polyclonal antibody by flow cytometry[J]. Environmental Microbiology Reports,2010,2(1):158-165.
- [5] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789.7—2008 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [6] 王路梅,杨晋川,郭惠,等. 荧光PCR与免疫磁珠技术相结合用于霍乱弧菌的检索[J]. 中国卫生检验杂志,2011,21(7):1807-1808.
- [7] 张东方,袁飞,王娉,等. 免疫磁捕获-实时荧光PCR快速检测鸡肉中沙门氏菌[J]. 食品与发酵工业,2011,37(8):142-146.
- [8] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000,28(12):63-68.
- [9] 张蕾,张西萌,张海予,等. 副溶血性弧菌鞭毛蛋白单克隆抗体的制备和在食品检测中的应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2013,29(7):734-738.
- [10] 余楠,车小燕. 免疫磁珠技术在病原微生物检测中的应用前景[J]. 中华检验医学杂志,2011,34(3):280-283.
- [11] 盛跃颖,陈敏. 免疫磁珠分离技术在病原微生物检测中的应用[J]. 中国食品卫生杂志,2011,23(5):478-480.
- [12] Tataravathy A, Peak K, Vequilla W, et al. An accelerated method for isolation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from artificial contaminated foods, using a short pre-enrichment, immunomagnetic separation, and xylose-lysine-desoxycholate agar (61X method)[J]. J Food Prot, 2009, 72(3):583-590.
- [13] 徐晓可,吴清平,张菊梅,等. 免疫磁珠分离技术在常见食源性致病菌检测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2011,19(5):1196-1198.

## 论著

# 应用酶联免疫技术建立鲜乳中 $\beta$ -内酰胺酶间接检测方法

姜侃<sup>1</sup>, 厉永纲<sup>2</sup>, 沈泓<sup>1</sup>, 刘鹏鹏<sup>1</sup>, 吴晨露<sup>1</sup>, 金燕飞<sup>1</sup>

(1. 浙江省质量检测科学研究院, 浙江 杭州 310013; 2. 捷和泰(北京)生物科技有限公司, 北京 102206)

**摘要:**目的 建立酶联免疫间接快速测定鲜乳中 $\beta$ -内酰胺酶的方法。方法 应用氨苄青霉素抗体,人工制备氨苄青霉素和辣根过氧化物酶的结合物 Amp-HRP,建立氨苄青霉素酶联免疫检测方法。应用该方法分别检测样品反应管和阴性对照管中氨苄青霉素,通过比较两者 OD<sub>450</sub>值,间接判断样品中是否含有 $\beta$ -内酰胺酶。结果 成功建立了酶联免疫间接快速测定鲜乳中 $\beta$ -内酰胺酶的方法,检测灵敏度可达0.0005 IU/ml。结论 该方法检测结果准确可靠,可广泛应用于鲜乳中 $\beta$ -内酰胺酶的检测。

**关键词:** $\beta$ -内酰胺酶; 酶联免疫; 鲜乳; 快速检测; 兽药残留; 抗生素

中图分类号:R155.5<sup>+</sup>7; TS207 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2013)05-0405-05

**The establishment of indirect ELISA method of  $\beta$ -lactamase in milk**

JIANG Kan, LI Yong-gang, SHEN Hong, LI Peng-peng, WU Chen-lu, JIN Yan-fei  
(Zhejiang Institute of Quality Inspection Science, Zhejiang Hangzhou 310013, China)

**Abstract: Objective** To establish an indirect ELISA method of  $\beta$ -lactamase detection in milk. **Methods** The Elisa method of Ampicillin was set up and optimized with ampicillin-HRP conjugate and Ampicillin antibody. The method was used to detect the ampicillin in samples and negative control, and  $\beta$ -lactamase was determined indirectly by comparing OD<sub>450</sub> values. **Results** The indirect ELISA method for  $\beta$ -lactamase was established, and the sensitivity was 0.0005 IU/ml. **Conclusion** This method was accurate and reliable, and could be widely applied to detect  $\beta$ -lactamase in milk.

**Key words:**  $\beta$ -lactamase; ELISA; milk; rapid detection; residues of veterinary drugs; antibiotics

乳制品安全问题一直是国内外关注的焦点,但近年来,一些不法生产者将 $\beta$ -内酰胺酶用于分解鲜乳中残留的 $\beta$ -内酰胺类抗生素,使乳制品抗生素残留项目符合标注要求。目前国内外对 $\beta$ -内酰胺酶的食用安全性尚无定论,但经 $\beta$ -内酰胺酶作用后的抗生素分解产物对人体健康构成潜在威胁<sup>[1]</sup>。卫生部也已发文明确指出“添加 $\beta$ -内酰胺酶(解抗剂)等非食品用物质属违法行为”<sup>[2-3]</sup>。国内有关 $\beta$ -内酰胺酶检测方法有头孢硝基噻吩显色法、酸度法、碘量法、高效液相色谱法、酶联免疫法和杯碟法等<sup>[4-6]</sup>,但都存在一些缺陷,如头孢硝基噻吩显色法、酸度法和碘量法的灵敏度较低、干扰因素较多,高效液相色谱法前处理复杂、噪音较大,酶联免疫法易受其他蛋白干扰,杯碟法操作复杂、检测周期长。本试验采用Elisa法测定反应管中 $\beta$ -内酰胺类抗生素含量的变化,间接检测乳品中是否含有 $\beta$ -内酰胺酶,并对样品前处理和Elisa检测条件进行了优化,取得了满意的效果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要仪器与试剂

酶标板(Costar公司)、Amicon MLtra-4超滤管(Millipore公司)。

氨苄青霉素抗体(Randox公司)、氨苄青霉素(Amp)(BBI公司)、 $\beta$ -内酰胺酶(阿拉丁试剂(上海)有限公司)、辣根过氧化物酶(HRP)(上海凯博生物有限公司)、氰尿酸氯(CC)、四甲基联苯胺(TMB)。

稀释缓冲液 MA Buffer 配方:每 L 体积溶液中包含 NaCl 5.8 g、CaCl<sub>2</sub> 1.7 g、BSA 10 g、Tris 6.1 g、Triton X-100 10 ml、Proclin-300 1 ml、Antifoam 40  $\mu$ l。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 Amp-HRP 结合物的制备

按照参考文献[7]制备 Amp-HRP 结合物,于-80℃以下保存备用,使用时将 Amp-HRP 溶液 OD<sub>403</sub> 值调整为 0.6 使用。

#### 1.2.2 氨苄青霉素抗体最佳包被浓度的选择

采用方阵滴定法,用包被液将氨苄青霉素抗体分别稀释成 1、2、4、6、10  $\mu$ g/ml 5 种浓度,分别置于 100  $\mu$ l/孔包被酶标板中,4℃包被过夜;含 0.05% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液(PBST)洗板一次,加入 200  $\mu$ l 10% 小牛血清,37℃封闭 1 h;PBST 洗板 3 次后,加入 50  $\mu$ l 阴性对照或 Amp 阳性对照,再加入 50  $\mu$ l 以 MA Buffer 按 1:20、1:24、1:30、1:40 和 1:60 稀释的 Amp-HRP 稀释液,37℃孵育 30 min;PBST 洗板 5 次后,加入 100  $\mu$ l TMB 底物,室温显色 15 min;用 2 mol/L HCl 终止反应,再用酶标仪测定 OD<sub>450</sub>。阴性质控为 10% 牛血清,阳性质控为含 4  $\mu$ g/L 氨苄青霉素的 10% 牛血清;包被液为 50 mM Tris-HCl(pH 为 8.5);封闭液为含 1% BSA、2.5% 蔗糖的 0.1 M Tris-HCl(pH 为 7.4)。

#### 1.2.3 氨苄青霉素酶联免疫竞争法标准曲线的建立及最低检测限的确定

氨苄青霉素抗体用最佳浓度包被微孔,分别在 10% 牛血清基质和无抗生素及 $\beta$ -内酰胺酶的鲜乳基质中配制氨苄青霉素钠标准溶液,氨苄青霉素的浓度分别为 0、1、5、10、50、100、200、500 ng/ml, Amp-HRP 以最佳稀释度稀释,由竞争 Elisa 得到的数据绘制标准曲线。当抑制率达到 10% 时氨苄青霉素的质量浓度即为该基质下氨苄青霉素最低检测限<sup>[7]</sup>。

#### 1.2.4 阴性对照的设定

在阴性对照管中加入适量的氨苄青霉素冻干品,再加入 200  $\mu$ l 10% 牛血清后充分混匀,使氨苄青霉素的浓度达到最适浓度。该最适浓度应为以 10% 牛血清基质和以鲜乳(不含抗生素和 $\beta$ -内酰胺酶)基质所绘制的标准曲线中偏离度相对较小的浓度点,且该浓度在两条标准曲线中 OD<sub>450</sub> 值的平均值最为接近。分别测试阴性对照管经 45℃加热处理 10 min 前后 Elisa 反应 OD<sub>450</sub> 值,以确定加热反应过程对氨苄青霉素的稳定性是否有影响,如结果比较差异无统计学意义,则无需对阴性对照管进行同步加热处理。

#### 1.2.5 样品前处理和检测

在样品反应管中加入适量的氨苄青霉素冻干

品,再加入 200  $\mu\text{l}$  样品后,反应管中氨苄青霉素的浓度应与 1.2.4 中所设阴性对照管中氨苄青霉素浓度一致。将该反应管在 45  $^{\circ}\text{C}$  加热反应 10 min 后作为待测液。分别取 50  $\mu\text{l}$  反应待测液和 50  $\mu\text{l}$  阴性对照液加入包被好的微孔,再分别加入 50  $\mu\text{l}$  最佳浓度的 Amp-HRP 稀释液,37  $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min,再经 PBST 洗涤 5 次,加入 100  $\mu\text{l}$  TMB 底物,室温显色 15 min 后,用 2 mol/L HCl 终止反应,再用酶标仪测定 OD<sub>450</sub> 值,比较样品反应管与阴性对照管 OD<sub>450</sub> 值。

### 1.2.6 $\beta$ -内酰胺酶检测灵敏度的测试和判定值的确定

将  $\beta$ -内酰胺酶用 45  $^{\circ}\text{C}$  的纯水稀释到 0.001、0.005、0.01 IU/ml,取 100  $\mu\text{l}$  已经稀释的  $\beta$ -内酰胺酶加入到 900  $\mu\text{l}$  的鲜乳中,使  $\beta$ -内酰胺酶终浓度分别是 0.0001、0.0005、0.001 IU/ml,分别取上述三种终浓度的  $\beta$ -内酰胺酶 200  $\mu\text{l}$  加入到 1.2.5 所设定的样品反应管中进行检测。各浓度反应管和阴性对照分别进行 10 次检测,计算其 OD<sub>450</sub> 的平均值( $\bar{x}$ )和标准差( $s$ )。当某浓度的  $\bar{x} \pm 3s$  与阴性对照的  $\bar{x} \pm 3s$  无交叉时,即确定该浓度为最低检出限。实际检测中,以阴性对照 OD<sub>450</sub> 值 + 最低检出限 OD<sub>450</sub> 值的 6s 作为最终的  $\beta$ -内酰胺酶阳性样本的判定值。

### 1.2.7 模拟样品和真实样品的测试

在 10 份无背景的鲜乳中添加已知浓度的  $\beta$ -内酰胺酶,终浓度范围为 0.001 0 ~ 0.0015 IU/ml。同时测试 10 份真实鲜乳样品,进一步测试方法的准确性和稳定性。

## 2 结果

### 2.1 Amp-HRP 结合物的制备

Amp、HRP 以及 Amp-HRP 的紫外扫描结果如图 1 所示。由图 1 可以看出,反应前 Amp 的特征吸收峰为 206 nm 左右,HRP 的特征吸收峰为 214 nm 左右,结合反应后 Amp-HRP 的特征吸收峰为 221 nm 左右,因此 Amp-HRP 具有 Amp 和 HRP 吸收峰的重叠,根据 UV 的加和性<sup>[8]</sup>可知,Amp-HRP 结合成功。

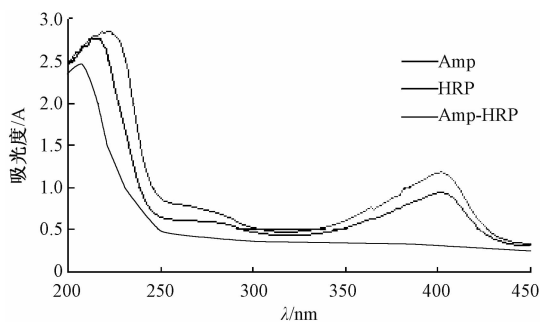


图 1 Amp、HRP 以及 Amp-HRP 的紫外扫描结果  
Figure 1 UV scan results of Amp, HRP and Amp-HRP

### 2.2 氨苄青霉素抗体最佳包被质量浓度的选择

不同包被质量浓度的氨苄青霉素抗体和不同稀释度的 Amp-HRP 做方阵滴定后的 OD<sub>450</sub> 值如表 1 所示。由表 1 可以看出,在 OD<sub>450</sub> 值接近 1.0、N/P 值在 1.5 以上并呈现最大者的包被质量浓度为 6 mg/L,Amp-HRP 的最佳稀释度为 1:30。

表 1 氨苄青霉素抗体和 Amp-HRP 方阵滴定的 OD<sub>450</sub> 值  
Table 1 OD<sub>450</sub> value of Ampicillin antibody and Amp-HRP matrix titration

Amp-HRP 稀释比例	氨苄青霉素抗体/(mg/L)						空白对照
	1	2	4	6	10		
1:20	N	0.724	0.926	1.032	1.294	1.603	0.053
	P	0.524	0.686	0.678	0.904	1.272	0.046
	N/P	1.38	1.35	1.52	1.43	1.26	
1:24	N	0.651	0.843	1.058	1.263	1.518	0.043
	P	0.491	0.603	0.704	0.883	1.138	0.051
	N/P	1.33	1.40	1.50	1.43	1.33	
1:30	N	0.555	0.652	0.754	1.024	1.396	0.038
	P	0.389	0.408	0.454	0.574	0.856	0.042
	N/P	1.43	1.60	1.66	1.78	1.63	
1:40	N	0.457	0.575	0.634	0.702	0.906	0.035
	P	0.296	0.376	0.404	0.491	0.676	0.035
	N/P	1.54	1.53	1.57	1.43	1.34	
1:60	N	0.321	0.398	0.468	0.537	0.711	0.051
	P	0.268	0.317	0.352	0.387	0.456	0.042
	N/P	1.20	1.26	1.33	1.39	1.56	

注:N 为氨苄青霉素阴性样本;P 为氨苄青霉素阳性样本;空白以不加 Amp-HRP 作为对照

### 2.3 氨苄青霉素免疫竞争法标准曲线的建立

Amp-Ab 用最佳包被质量浓度(6 mg/L)以及最佳包被条件(4  $^{\circ}\text{C}$  过夜)包板,Amp-HRP 以 1:30 稀释,直接竞争免疫反应后分别获得以 10% 牛血清和空白生牛乳为基质的标准品的检测数据,如表 2 和表 3 所示;绘制的标准曲线由图 2、图 3 所示。

从标准曲线数据分析,当以质量分数为 10% 牛血清为基质时,抑制率达到 10% 时需要的氨苄青霉素的质量浓度为 0.6  $\mu\text{g/L}$ ,即检测限为 0.6  $\mu\text{g/L}$ ;当以生牛乳为基质时,抑制率达到 10% 时需要的氨苄青霉素的质量浓度为 0.7  $\mu\text{g/L}$ ,即检测限为 0.7  $\mu\text{g/L}$ 。

从变异系数分析,当抗生素浓度处于相对较低或较高情况时,系统变异系数相对较高,提示已经接近该系统的检测线性范围。虽然在标准曲线各浓度点与实测浓度存在一定偏离度,但该系统检测标准曲线线性良好,相关系数在 99% 以上,符合检测要求。

### 2.4 阴性对照管和样品反应管氨苄青霉素浓度的设定

从表 3 和表 4 可以看出,当氨苄青霉素浓度达到 4  $\mu\text{g/L}$  时,其 OD<sub>450</sub> 值的偏离度相对较小,且两种基质中该浓度测得的 OD<sub>450</sub> 平均值的差值仅为 0.010,因此将 4  $\mu\text{g/L}$  确定为阴性对照管和样品反应管氨苄青霉素的终浓度,即在已经加入适量的氨苄青霉素冻干品的管中加入 200  $\mu\text{l}$  10% 牛血清或鲜乳样品后,其

表2 以10%牛血清为基质的氨苄青霉素标准品检测 OD<sub>450</sub>值  
Table 2 OD<sub>450</sub> value of ampicillin standard detection in 10% bovine serum

平行	质量浓度/( $\mu\text{g/L}$ )									
	0	1	2	3	4	5	10	50	100	200
1	1.203	0.981	0.893	0.851	0.787	0.751	0.622	0.311	0.237	0.171
2	1.257	0.977	0.913	0.863	0.803	0.767	0.613	0.317	0.228	0.182
3	1.244	0.948	0.907	0.842	0.810	0.758	0.611	0.328	0.223	0.178
4	1.198	0.983	0.892	0.847	0.802	0.751	0.631	0.310	0.231	0.170
OD <sub>450</sub> 平均值 $\bar{x}$	1.226	0.972	0.901	0.851	0.801	0.757	0.619	0.317	0.230	0.175
变异系数/%	2.4	1.7	1.2	1.1	1.2	1.0	1.5	2.6	2.5	3.3
偏离度/%	—	25.4	3.8	13.0	11.6	8.0	5.5	31.0	10.5	23.3

表3 以生鲜牛乳为基质的氨苄青霉素标准品检测 OD<sub>450</sub>值

Table 3 OD<sub>450</sub> value of ampicillin standard detection in milk

平行	质量浓度/( $\mu\text{g/L}$ )									
	0	1	2	3	4	5	10	50	100	200
1	1.263	1.052	0.976	0.871	0.812	0.766	0.591	0.248	0.173	0.098
2	1.282	1.096	0.998	0.853	0.793	0.725	0.577	0.251	0.126	0.074
3	1.251	1.004	0.965	0.902	0.807	0.737	0.613	0.277	0.154	0.087
4	1.253	1.030	0.948	0.869	0.833	0.731	0.611	0.254	0.151	0.102
OD <sub>450</sub> 平均值 $\bar{x}$	1.262	1.046	0.972	0.874	0.811	0.740	0.598	0.258	0.151	0.090
变异系数/%	1.1	3.7	2.2	2.3	2.0	2.5	2.9	5.1	12.8	13.9
偏离度	—	14.2	16.9	8.7	5.9	8.4	11.5	26.3	8.6	26.0

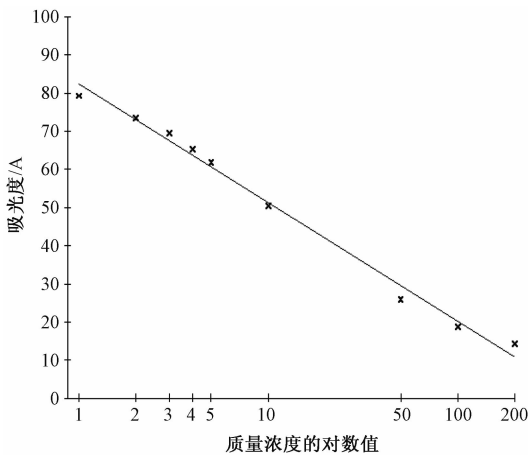


图2 以10%牛血清为基质的检测标准曲线

Figure 2 Ampicillin standard curve in 10% bovine serum

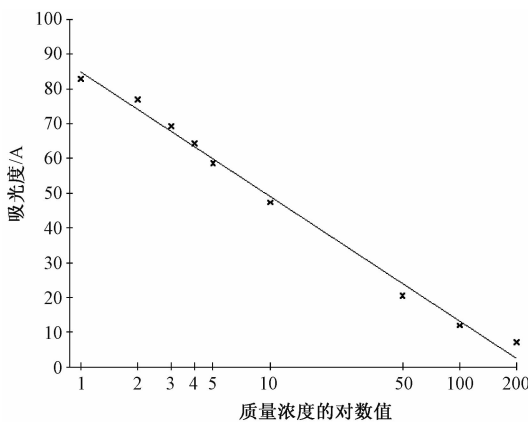


图3 以生鲜牛乳为基质的检测标准曲线

Figure 3 Ampicillin standard curve in milk

中的氨苄青霉素浓度为  $4 \mu\text{g/L}$ 。将阴性对照管经  $45^\circ\text{C}$  加热处理 10 min 前后酶联免疫反应 OD<sub>450</sub> 的值

比较差异无统计学意义,说明该加热过程对阴性对照稳定性无明显影响,可直接用于检测。

### 2.5 $\beta$ -内酰胺酶检测灵敏度和阳性判定值

从表4中可见,当 $\beta$ -内酰胺酶终浓度为  $0.0005 \text{ IU/ml}$  时,其酶联免疫测试最终的 OD<sub>450</sub> 值  $\bar{x} \pm 3s$  的范围为  $0.957 \sim 1.160$ ,而阴性对照  $\bar{x} \pm 3s$  的范围为  $0.712 \sim 0.925$ ,二者之间无交叉,因此确定该方法的最低检测限为  $0.0005 \text{ IU/ml}$ 。同时,该浓度下测试的  $s=0.034$ ,因此将阴性对照 OD<sub>450</sub> 值 + 0.2 (即  $6s$  值) 确定为阳性样品的判定值,即当样品 OD<sub>450</sub> 测定结果高于该数值则判定样品中含有  $\beta$ -内酰胺酶,若低于则判定样品中不含有  $\beta$ -内酰胺酶。

表4  $\beta$ -内酰胺酶检测灵敏度和阳性判定值测试 OD<sub>450</sub> 值  
Table 4 OD<sub>450</sub> value of  $\beta$ -lactamases detection sensitivity and positive cutoff determination

样品	阴性对照	$\beta$ -内酰胺酶浓度/( $\text{IU/ml}$ )		
		0.0001	0.0005	0.0010
1	0.776	0.998	1.023	1.269
2	0.877	0.987	1.104	1.192
3	0.784	0.863	1.097	1.296
4	0.815	0.839	1.065	1.359
5	0.831	0.995	1.047	1.299
6	0.810	0.813	1.081	1.201
7	0.801	1.011	1.093	1.45
8	0.788	0.990	1.035	1.393
9	0.822	0.804	1.039	1.223
10	0.877	0.997	1.015	1.321
$\bar{x}$	0.818	0.962	1.059	1.300
$s$	0.035	0.050	0.034	0.084
变异系数/%	4.3	5.2	3.2	6.5
$3s$	0.106	0.149	0.102	0.252
$\bar{x} + 3s$	0.925	1.111	1.160	1.552
$\bar{x} - 3s$	0.712	0.813	0.957	1.048

## 2.6 模拟样品和真实样品测试

取模拟牛奶样品(已知 $\beta$ -内酰胺酶浓度)、真实样品(鲜乳样品)各10份,采用酶联免疫间接检测法对两种样品进行测试,结果见表5。结果证实,该免疫分析法可成功地用于检测鲜乳中的 $\beta$ -内酰胺酶,已知阳性的牛奶经该法确认为阳性,10份真实样品的检测结果均呈阴性,进一步证实本试验所建立的酶联免疫间接测试法可用于定性检测鲜乳中的 $\beta$ -内酰胺酶。

表5 模拟样品和真实样品检测结果

样品编号	OD <sub>450</sub> 值	检测结果
阴性对照	0.824	—
模拟样品1	1.205	阳性
模拟样品2	1.215	阳性
模拟样品3	1.230	阳性
模拟样品4	1.155	阳性
模拟样品5	1.102	阳性
模拟样品6	1.300	阳性
模拟样品7	1.235	阳性
模拟样品8	1.110	阳性
模拟样品9	1.185	阳性
模拟样品10	1.245	阳性
真实样品11	0.880	阴性
真实样品12	0.852	阴性
真实样品13	0.831	阴性
真实样品14	0.869	阴性
真实样品15	0.790	阴性
真实样品16	0.825	阴性
真实样品17	0.850	阴性
真实样品18	0.820	阴性
真实样品19	0.845	阴性
真实样品20	0.855	阴性

## 3 讨论

本研究应用氨苄青霉素抗体,并人工制备了氨苄青霉素和辣根过氧化物酶的结合物 Amp-HRP,建立了稳定的氨苄青霉素酶联免疫检测方法。通过该方法测试样品与反应管中氨苄青霉素反应并测定 OD<sub>450</sub>值后,与阴性对照测试所得的判定值进行比较,从而间接判断样品中是否含有 $\beta$ -内酰胺酶。如果样品中含有 $\beta$ -内酰胺酶,则反应管中的氨苄青霉素会因被分解而使浓度降低,因此测试后 OD<sub>450</sub>值会较阴性对照有较大升高。

设置阴性对照时,氨苄青霉素必须采用冻干品以维持标准品的稳定性,并在检测过程中现配现用,以防止氨苄青霉素降解而导致结果的偏差。阴性对照经45℃加热处理10 min后检测得到的

OD<sub>450</sub>值,与未经加热处理的阴性对照检测的 OD<sub>450</sub>值比较差异无统计学意义,因此实际检测中阴性对照无需同步进行加热处理,可直接用于检测。

样品前处理时,考虑使用离心脱脂的方法消除脂肪对酶联免疫反应可能存在的干扰。测试发现离心或不离心的样品检测获得的 OD<sub>450</sub>值比较差异无统计学意义,因此实际检测中可将鲜乳直接进行样品前处理,从而进一步简化了样品前处理步骤。

方法重复性和灵敏度评价时,检测数据的3s是重要指标。重复性试验时检测结果均需落在平均值 $\pm 3s$ 范围内,实际测试时测试值均符合要求。而0.0005 IU/ml的检测灵敏度完全可以满足日常检测的需求。实际检测中阳性判定线的确定,以阴性对照 OD<sub>450</sub> + 0.2,主要考虑操作者可能因操作不熟练或其他原因引起的偏差扩大,因此将 OD<sub>450</sub>阳性判定值差扩大为6s值(即0.2)。

总之, $\beta$ -内酰胺酶的检测方法研究还处于初期阶段。本法操作简便,检测周期短、灵敏度高,但只能满足定性检测的需要,在定量检测研究方面还存在空白。而样品中存在的 $\beta$ -内酰胺酶除了人为添加外,还可能来源于微生物<sup>[1]</sup>,目前各种检测方法还无法对此两种来源的 $\beta$ -内酰胺酶进行区分,这可能致使检测中出现假阳性情况。

## 参考文献

- [1] 崔生辉,李景云,马越,等. 生鲜牛乳抗生素分解剂的鉴定与检测[J]. 中国食品卫生杂志,2007,19(2):113-116.
- [2] 卫生部. 关于印发《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近期工作重点及要求》的通知(卫监督发[2009]21号)[EB/OL]. (2009-03-06)[2013-07-05] <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0056/38681.html>.
- [3] 卫生部. 关于印发《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抽检工作指导原则和方案》的通知(食品整治办[2009]29号)[EB/OL]. (2009-03-23)[2013-07-05] <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohwsjdj/s3594/200903/39650.htm>.
- [4] 桂炳东.  $\beta$ -内酰胺酶测定进展及临床意义[J]. 临床检验杂志,2002,20(增刊):64-66.
- [5] 唐群力. 两种 $\beta$ -内酰胺酶检测方法的应用比较[J]. 检验医学与临床,2008,5(7):427-428.
- [6] 薛晓晶,李玲,金涌,等. 杯碟法检测乳中的 $\beta$ -内酰胺酶[J]. 食品科学,2011,32(4):216-219.
- [7] 姜侃,陈宇鹏,金燕飞,等. 应用酶联免疫法快速检测乳品中 $\beta$ -内酰胺类抗生素残留[J]. 中国乳品工业,2010,38(1):51-54.
- [8] 黄丽. 抗AMP单抗的制备及牛奶中AMP残留ELISA检测方法的建立[D]. 南昌:南昌大学,2007.