



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99809405.6

[45] 授权公告日 2004 年 4 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1145029C

[22] 申请日 1999.3.30 [21] 申请号 99809405.6

[30] 优先权

[32] 1998.6.25 [33] BE [31] 9800485

[86] 国际申请 PCT/EP1999/002166 1999.3.30

[87] 国际公布 WO99/67416 法 1999.12.29

[85] 进入国家阶段日期 2001.2.6

[71] 专利权人 UCB 公司

地址 比利时布鲁塞尔

[72] 发明人 J·迪戈兰 B·戈兰尼尔

J-M·福雷尔 B·卓利斯

审查员 王丽华

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利

商标事务所

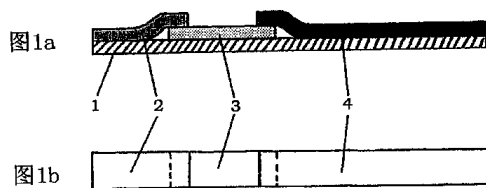
代理人 陈文平

权利要求书 2 页 说明书 21 页 附图 1 页

[54] 发明名称 测定含有 β - 内酰胺核的抗生素的方法以及试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及在生物液体中检测具有 β - 内酰胺核的抗生素的方法，其包括如下步骤：a) 用一定量的识别试剂接触确定体积的所述生物液体，并在该识别试剂与所述液体中可能存在的抗生素形成复合物的条件下孵育获得的混合物；b) 在参照抗生素与步骤 a) 中没有反应的鉴定试剂形成复合物的条件下，用至少一种固定在支持物上的参照抗生素与步骤 a) 获得的混合物接触；和 c) 测定结合在支持物上的识别试剂的量。本发明的特征在于识别试剂包含获自地衣芽孢杆菌并对具有 β - 内酰胺核的抗生素敏感的受体 BlaR 或 BlaR - CTD。本发明还公开了通过上述方法在生物液体中检测抗生素的检测试剂盒，其包括至少一种识别试剂和至少一种固定在支持物上的参照抗生素。



1. 在生物液体中检测含有 β -内酰胺核的抗生素的方法，其包括如下步骤：
 - a) 用一定量的识别试剂接触确定体积的所述生物液体，并在允许该识别试剂与所述生物液体中可能存在的抗生素形成复合物的条件下，孵育由此获得的混合物，
 - b) 在允许参照抗生素与步骤 a) 中没有反应的识别试剂形成复合物的条件下，用至少一种固定在支持物上的参照抗生素与步骤 a) 获得的混合物接触，和
 - c) 测定结合在支持物上的识别试剂的量，
其特征在于识别试剂包含获自地衣芽孢杆菌并对含有 β -内酰胺核的抗生素敏感的受体，所述受体为受体 BlaR 或受体 BlaR 羧基端区域 (BlaR-CTD)。
2. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于所述对含有 β -内酰胺核的抗生素敏感的受体与选自金属胶体颗粒，硒、碳、硫或碲的胶体颗粒，或有色合成乳胶的胶体颗粒的标记试剂偶联。
3. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于所述对含有 β -内酰胺核的抗生素敏感的受体与选自荧光物质的标记试剂偶联。
4. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于所述对含有 β -内酰胺核的抗生素敏感的受体与选自酶的标记试剂偶联。
5. 根据权利要求 4 的方法，其中所述酶为碱性磷酸酶、过氧化物酶和 β -内酰胺酶。
6. 根据权利要求 4 的方法，其特征在于对所述抗生素敏感的受体通

过化学或遗传学途径与酶标记试剂偶联。

7. 根据权利要求 6 的方法，其特征在于所述对含有 β -内酰胺核的抗生素敏感的受体在步骤 a) 之前与标记试剂偶联。

8. 根据权利要求 7 的方法，其特征在于所述对含有 β -内酰胺核的抗生素敏感的受体在步骤 a) 过程中或之后与标记试剂偶联。

9. 根据权利要求 8 的方法，其特征在于步骤 a) 和步骤 b) 同时发生。

10. 根据权利要求 9 的方法，其特征在于步骤 b) 中所用的支持物选自参照抗生素包被的管、板或柱。

11. 根据权利要求 10 的方法，其特征在于步骤 b) 中所用的支持物是包含具有第一或第二末端的固相支持物 (1) 的检验装置，从第一末端开始其上连续结合了

- 用于纯化被分析液体的膜 (2)，
- 其上固定了至少一种参照抗生素的膜 (3)，和
- 吸附性膜 (4)。

12. 根据权利要求 11 的方法，其特征在于步骤 b) 中所用的支持物由一套磁性或非磁性珠组成。

13. 用于通过权利要求 1-12 之任一项的方法在生物液体中检测抗生素的检验试剂盒，其包括至少一种识别试剂和至少一种固定在支持物上的参照抗生素，其中该识别试剂获自地衣芽孢杆菌并是对含有 β -内酰胺核的抗生素敏感的受体 BlaR 或受体 BlaR-CTD。

测定含有 β -内酰胺核的抗生素的方法以及试剂盒

本发明涉及使用对含有 β -内酰胺核的抗生素敏感的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 受体在生物液体中测定含有 β -内酰胺核的抗生素的快速敏感的新方法。本发明还涉及用于实施该方法的试剂盒。

目前, 抗生素的使用非常广泛, 它不仅在细菌引起的感染疾病的治疗中作为治疗剂, 而且用作食物保存剂和刺激生长的动物饲料添加剂。因此, 人们越来越感觉到, 需要能够在复杂的生物液体或缓冲水介质中检测即使是非常低浓度的抗生素的存在, 所述生物液体例如奶、尿、血液、血清、唾液、肉提取物、发酵液。

一个例子是奶的生产, 因为使用抗生素治疗奶牛的某些感染疾病是众所周知的。

然而, 由于明显的医学原因, 原则上用于人类食用的奶必须没有任何微量抗生素。而且, 在奶产品如奶酪、酸乳等的生产过程中, 0.005 I. U. /ml 或更低浓度的青霉素即可产生不利影响。

可设想几种情况。在第一种情况中, 例如为了在装入货车前在农场中检测抗生素的存在, 将优选一种极为快速(少于5分钟)而简单的检验方法。也可设想在例如用于治疗的抗生素已知、而且该检验能检测法定标准的所述抗生素时使用这种快速检验。在第二种情况下, 当重点不是速度时, 重要的是检测大部分(如果不是全部)法定标准的抗生素。

实际上, 一些国家的法律实行非常明确的质量标准。例如美国官方要求奶中下列六种抗生素的浓度不超过非常明确的值: 青霉素, 5 ppb; 氨苄青霉素, 10 ppb; 阿莫西林, 10 ppb; 氯唑西林, 10 ppb; 头孢匹林, 20 ppb; 头孢噻吩, 50 ppb。欧盟实行如下质量标准: 青霉素, 4 ppb; 阿莫西林, 4 ppb; 氨苄青霉素, 4 ppb; 氯唑西林, 30 ppb; 双氯西林, 30 ppb; 苯唑西林, 30 ppb; 头孢匹林, 10 ppb; 头孢噻吩, 100 ppb; 头孢喹肟 20 ppb; 萘夫西林 30 ppb; 头孢唑啉, 50ppb。

因此，具有可检测大多数抗生素的检验方法是有利的。而且，在乳品加工业可以认为，由于没有兼有快速、灵敏和简便特征的检验方法，能最佳组合这三个参数的检验方法将是有利的，即使它们并没有被完全满足。

为在生物液体中检测含有 β -内酰胺核的抗生素，已提出了各种类型的检验方法。通常这些检验所采用的检测方法使用特异识别抗生素或该抗生素类似物的识别试剂（受体或抗体）和标记试剂（放射性元素、酶、荧光试剂等）。根据所选试剂不同，可使用所谓的放射免疫分析（RIA）、放射性受体分析（RRA）、酶免疫分析（EIA）等。根据它们的一般原则，这些检验采用上述两种试剂（检测试剂）的最小组合，该组合应可获得其数值指示存在的抗生素的量的结果。

应当注意，根据所选择的检测方法，标记试剂可与识别试剂偶联，或通过识别试剂的识别与抗生素或抗生素类似物偶联。也有一些方法，其中识别试剂或抗生素或抗生素类似物本身含有标记试剂（例如放射性标记的抗生素）。

美国专利 4,239,852 描述了在奶中检测具有 β -内酰胺核抗生素的微生物学方法。根据该方法，将奶样品首先在对抗生素高度敏感的微生物特别是嗜热脂肪芽孢杆菌（*Bacillus stearothermophilus*）的细胞部分存在时孵育，然后在标记了放射性元素或酶的抗生素存在下孵育。孵育的条件是允许样品中可能存在的抗生素和标记的抗生素与细胞部分结合。

孵育后，细胞部分从混合物中分离，然后洗涤。之后测定与细胞部分结合的标记抗生素的量，并与标准品比较。与细胞部分结合的标记抗生素的量与所分析的奶样品中存在的抗生素的浓度成反比。

该方法要求相当精确的操作，尤其是在细胞部分从混合物中分离阶段。此外，在其最灵敏的版本中，该方法使用放射性元素（ ^{14}C 或 ^{125}I ）标记的抗生素，其中该版本可在牛奶中检测达 0.01 I.U./ml，甚至 0.001 I.U./ml 的青霉素 G。在这种情况下，对牛奶中可能存在的抗生素量的测定必需使用特殊仪器例如闪烁计数器。此外，处理即使非常小量的放射

性产品对进行该分析的人员也不是完全没有危险。

欧洲专利申请 593 112 描述了另一种在奶中检测抗生素的方法。该方法使用从抗生素敏感微生物如嗜热脂肪芽孢杆菌中分离的一种蛋白质。该蛋白质还标记了酶如过氧化物酶。

该检验按如下进行：奶样品在所述标记蛋白质存在下于一管中孵育；孵育后，将奶转移至管壁已固定了参照抗生素的第二管中；进行第二次孵育，然后除去管中的内容物；用洗涤溶液洗涤第二管管壁三次，除去洗涤液，然后将第二管中存在的残余物转移至一张吸附纸上；再向第二管中加入显色底物，再次孵育，然后加入终止显色的溶液；将该管的显色与用抗生素标准样品平行进行的相同实验的显色比较。支持物上固定的标记蛋白的量，继而显色强度与所分析的奶样品中存在的抗生素的量成反比。

根据该专利申请的实施例 1，该检验可检测浓度低至约 5ppb 的青霉素 G，并可检测到阿莫西林 (5 ppb)、氨苄青霉素 (10 ppb)、头孢匹林 (5 ppb) 和头孢噻呋 (5 ppb)。该检验不能检测高达欧洲法规所实行水平的青霉素、阿莫西林和氨苄青霉素，另一方面，该检测相当复杂，不能完全达到本发明所追求的灵敏和简便的标准。

还已知另一种酶学方法，该方法可测定奶中低浓度的抗生素 (J.M. Frere 等，抗微生物药物和化学疗法 (Antimicrobial Agents and Chemotherapy), 18(4), 506-510 (1980)，以及专利 EP 85 667 和 EP 468 946)，该方法基于特定酶的使用，即马杜拉放线菌 R39 (Actinomadura R39) 产生的可溶性细胞外 D-丙氨酰-D-丙氨酸羧肽酶 (下文称作“酶 R39”)。酶 R39 具有水解各种肽的 D-丙氨酰-D-丙氨酸基团的特异活性，并能水解某些硫酸酯。

此外，酶 R39 与具有 β -内酰胺核的抗生素反应迅速形成无活性和基本不可逆的等摩尔酶-抗生素复合物。

该检验的最新版本中 (EP 468 946)，在允许样品中可能存在的 β -内酰胺抗生素与该酶反应形成无活性和基本不可逆的等摩尔酶-抗生素复合物的条件下，将给定体积的待测液体样品与预定量的酶 R39 孵育。

然后，在允许硫酯类底物被第一次孵育过程中未与抗生素形成复合物的残余酶 R39 水解的条件下，将确定量的硫酯类底物与第一阶段获得的产物孵育。然后采用可通过与巯基链烷酸的游离 SH 基团反应显色的试剂，经比色分析测定由此形成的巯基链烷酸的量。显色强度与预先从含有已知量抗生素的样品建立的标准比较。定量测定可通过在分光光度计中测量来进行；对于奶，必需预先净化样品。

根据专利 EP 468,946 的实施例，该方法可在奶中共 5 分钟的孵育时间里测定 10 ppb 青霉素 G，共 15 分钟的孵育时间里测定约 2.5 ppb 青霉素 G。

对于在食品中检测抗生素的方法所必需的快速、简便和灵敏的标准，本申请人自己设定了探索生物液体中检测抗生素的更有效的新方法的目标。特别地，申请人自己设定了探索在单次检验中测定欧洲和美国政府规定的大多数抗生素之方法的目标。而且，所探索的方法应当可以在少数步骤中获得该结果，优选这些步骤可被非技术人员操作。本申请人还寻求了用比现有方法更短的孵育时间实现这些目标的方法。

本申请人最近发现在生物液体中检测含有 β -内酰胺核的抗生素的新方法，这些方法可以较好地实现这些目标。

因此，本发明涉及在生物液体中检测含有 β -内酰胺核的抗生素的新方法，其包括如下步骤：

- a) 用一定量的识别试剂接触确定体积的所述生物液体，并在允许该识别试剂与所述液体中可能存在的抗生素形成复合物的条件下，孵育获得的混合物；
- b) 在允许参照抗生素与步骤 a) 中没有反应的识别试剂形成复合物的条件下，用至少一种固定和支持物上的参照抗生素与步骤 a) 获得的混合物接触；和
- c) 测定结合在支持物上的识别试剂的量，其特征在于识别试剂包括获自地衣芽孢杆菌并对含有 β -内酰胺核的抗生素敏感的受体。

其中，术语“参照抗生素”是指在结构方面类似于待测抗生素而能与识别试剂结合形成复合物从而在检测体系中起到参照作用的抗生素物

质。参照抗生素被固定在支持物上。在步骤 a) 中，识别试剂与生物液体中含 β -内酰胺环的测试抗生素复合。取决于含 β -内酰胺环的测试抗生素的量，会有或多或少的游离识别试剂留下，其在步骤 b) 中与固定的参照抗生素复合。最终测定与支持体结合的识别试剂的量。该量与最初存在于生物液体中的测试抗生素呈负相关。

图 1 描述了一种根据本发明可使用的支持物，其是一种检验装置，包括固相支持物 (1) 及其上附着的膜 (2)、(3) 和 (4)。图 1a 是正面

图，图 1b 是该检验装置的纵向横截面图。

本发明的方法的优越性基于特异识别试剂的使用，该识别试剂包括获自地衣芽孢杆菌并对含有 β -内酰胺核的抗生素敏感的受体，即 BlaR 蛋白，Y. Zhu 等（细菌杂志（J. Bacteriol.），1137-1141，（1990））描述了其分离和肽序列，或 BlaR-CTD 多肽，BlaR-CTD 是 BlaR 的羧基端区域，B. Joris 等（FEMS Microbiology Letters, 107-114, (1990)）描述了其分离和肽序列。

本发明使用受体 BlaR 或 BlaR-CTD 检测含有 β -内酰胺核的抗生素比迄今所使用的识别试剂具有明显的优点。其理由是受体 BlaR 或 BlaR-CTD 能非常迅速地与非常大量的抗生素形成复合物，并且比已知识别试剂例如获自嗜热脂肪芽孢杆菌的受体需要更短的孵育时间。

作为通过本发明的方法可检测的抗生素的例子，可提到的是如下抗生素：苄基青霉素（或青霉素 G），氨苄青霉素，阿莫西林，羧苄西林，甲基西林（methylcillin），氯唑西林，6-氨基青霉烷酸，单环内酰胺（monolactam），氨基曲南，美西林，头孢氨苄，头孢来星，头孢噻啶，头孢硝噻吩，头孢噻肟，头孢呋辛，头孢噻唑，头孢匹林，7-氨基头孢酸（7-aminocephalosporanic acid）。更具体地，本发明的方法可检测美国和欧洲政府所控制的低至所能接受的极限阈值的所有抗生素。

本发明的方法允许在生物液体如奶、尿、血液、血清、唾液、肉提取物、发酵液，或缓冲水介质中检测含有 β -内酰胺核的抗生素。

根据本发明方法的一个优选实施方案，识别试剂以偶联标记试剂的形式使用。该标记试剂可是各种性质的。该标记试剂可是微粒型的，例如金属胶体颗粒（铂、金、银等），硒、碳、硫或碲的胶体颗粒，或有色合成乳胶的胶体颗粒。该标记试剂还可是荧光物质例如活化荧光素（可获自 Boeringher-Mannheim Biochemica）、荧光素异氰酸酯、罗丹明四甲基异氰酸酯、或本领域技术人员已知的任何其它荧光物质。该标记试剂还可是酶，例如 β -内酰胺酶、过氧化物酶、磷酸酶等。在这种情况下，受体 BlaR 或 BlaR-CTD 可通过化学或遗传学方法与该酶性质的标记试剂偶联形成融合蛋白。

该识别试剂可根据本领域技术人员已知的传统方法与标记试剂偶联。识别试剂可直接与标记试剂相连，或通过形成中间复合物与之相连。识别试剂和标记试剂之间的偶联可在本发明方法实施过程中的不同时间进行。根据第一个实施方案，识别试剂和标记试剂之间的偶联在识别试剂与待分析的生物液体接触之前进行。根据本发明的其它实施方案，识别试剂和标记试剂的偶联可在识别试剂与生物液体样品接触时或之后进行。优选地，识别试剂的标记在识别试剂与待分析样品接触之前进行。

根据本发明的方法的第一步 a) 包括将一定体积的生物液体与一定量的识别试剂接触，并在允许该识别试剂与该生物液体中可能存在的抗生素形成复合物的条件下，孵育获得的混合物。

生物液体可在 4-60℃ 的温度范围内与受体 BlaR 或 BlaR-CTD 孵育。优选地，该温度是约 47℃。孵育温度的增加可缩短孵育时间，反之亦然。因此，总是可以通过增加温度来缩短该方法的时间。

在根据本发明的方法的第二步 b) 中，将步骤 a) 中获得混合物与至少一种固定在支持物上的参照抗生素接触。

根据本发明可使用的支持物可是多种类型的。它们可是固相支持物，如包被了参照抗生素制品的管、盘或柱。其可是结合了膜的固相支持物形式的检验装置，在一个检验区域放置了一或多种捕获物质。它们可以是能形成凝胶并固定了参照抗生素的磁性或非磁性珠形式的支持物（琼脂糖、聚苯乙烯等）。

参照抗生素可通过本领域技术人员已知的方法固定在支持物上，例如通过与支持物共价或非共价吸附，吸附可选择性地通过间隔子来进行。

根据本发明的一个具体实施方案，步骤 a) 和 b) 可同时进行。

本发明的方法的步骤 c) 包括测定与固定了参照抗生素的固相支持物结合的受体。该测定所用方法与所用标记试剂的类型直接相关。如果标记试剂是酶，测定步骤将涉及与该酶特异的反应，该反应与例如一定颜色的产生相关。如果标记试剂是荧光性质的，该测定将通过简单测量支持物上的荧光来进行。对于金属颗粒或有色乳胶，与支持物结合的受体的存在通过其强度与支持物上结合的受体的数量成正比的颜色来反映。

不管使用何种类型的标记试剂，所检测的信号强度与分析样品中存在的抗生素的量成反比。

本发明还涉及用于测定生物液体中的抗生素的检验试剂盒，其包括至少一种识别试剂和至少一种固定在支持物上的参照抗生素，其中该识别试剂包含获自地衣芽孢杆菌并对含有 β -内酰胺核的抗生素敏感的受体。

下列实施例阐述了实施本发明的各方面和实施方式，但其并不限制本发明的范围。

实施例 1. 测定奶中含有 β -内酰胺核的抗生素。

本实施例阐述在奶中测定卫生部门控制的含有 β -内酰胺核的抗生素。本实施例中所描述的检验使用与用作标记试剂的金珠偶联的 BlaR-CTD 受体，并使用检验装置形式的支持物，其包含结合了膜的固相支持物。

1.1. BlaR-CTD 与金珠的偶联

1.1.1. BlaR-CTD 的生物素化

将 3.79ml BlaR-CTD (浓度 6.6 mg/ml) 识别试剂溶液加至 20 mM pH 7 的磷酸钠缓冲液中。然后向该 BlaR-CTD 溶液中加入 41.71ml 的碳酸氢盐缓冲液 (0.1 M 碳酸氢钠, pH 9) 和 2ml 同样溶于碳酸氢盐缓冲液的 2.23mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺 6-(生物素酰氨基)己酸酯溶液。室温避光在 LABINCO 转轴管式搅拌器 (可获自 VEL, 比利时) 上以 2 转/分钟的速度温和搅拌该溶液 2 小时。在相同条件下将 2.5ml Tris 缓冲液 (1 M pH 8) 与反应混合物孵育 30 分钟。由此获得的溶液对 HNM 缓冲液 (Hepes 100 mM, pH 8, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM) 透析 24 小时。以这种方式获得溶于 HNM-BSA 缓冲液 (Hepes 500 mM, pH 8, NaCl 500 mM, MgCl₂ 250 mM, BSA 10 mg/ml) 中浓度达 250 μ g 生物素化 BlaR-CTD/ml 缓冲液的生物素化 BlaR-CTD 溶液。该溶液保存于 -20 $^{\circ}$ C。

1.1.2. 标记试剂

标记试剂使用沉积了羊抗生物素抗体的直径 40nm 的金颗粒，其是溶

于 2mM 四硼酸钠水溶液 (pH 7.2) 中的悬液形式, 采用 0.1% 叠氮化钠 (可获自 British Biocell (Ref. GAB40)) 稳定化。该悬液在 520nm 处的光密度约为 10, 蛋白质浓度约为 24 μ g/ml。

1.1.3. 生物素化 BlaR-CTD 与金颗粒偶联

实施例 1.1.1 中制备的生物素化 BlaR-CTD 用 HNM-BSA 缓冲液 (Hepes 500 mM, pH 8, NaCl 500 mM, MgCl₂ 250 mM, BSA 10 mg/ml) 稀释 114.7 倍。室温混合 22.5 份体积的该生物素化 BlaR-CTD 稀释溶液、7.5 份体积的 HNM-BSA 缓冲液、9.27 份体积用于标记生物素化 BlaR-CTD 的金颗粒悬液和 6 份体积的参照金颗粒悬液 (见下面实施例 1.1.4)

1.1.4. 独立参照

在该检验中还采用一种参照物质, 根据它提供的条带强度能快速定量样品中存在的抗生素。

为此, 采用其上沉积了羊抗兔免疫球蛋白抗体的 40nm 金颗粒。该颗粒可从 British Biocell (Ref. GAR40) 以 0.1% 叠氮化钠稳定的溶于 2mM 四硼酸钠水溶液 (pH 7.2) 的悬液形式获得。该悬液在 520nm 处的光密度约为 3, 蛋白质浓度约为 6 μ g/ml。

1.2. 检测装置

所用检测装置包括具有第一和第二末端的固相支持物 (1), 从第一末端开始其上连续结合了

- 用于纯化被分析液体的膜 (2),
- 其上固定了两种捕获物质 (参照抗生素和能结合独立参照物的物质) 的膜 (3), 和
- 吸附膜 (4)。

1.2.1 组装分析装置

首先按照下列方法使用 Clamshell Laminator 型层压机 (可获自 BioDot 公司) 组装 300 \times 76.2 mm 大小的卡片:

裁出 300 \times 76.2 mm 大小的 ArCare 8565 型长方形塑料支持物 (可获自 Adhesive Research) (支持物 (1))。然后, 裁出 300 \times 20 mm 大

小的长方形 Leukosorb LK4 膜(可获自 Pall Gelman Sciences) (膜(2))、300 × 25 mm 大小的长方形 Hi-Flow SX 膜(可获自 Millipore) (膜(3))、300 × 40 mm 大小的长方形 3 mm 纤维素膜(可获自 Whatmann) (膜(4))。

在层压机下面模型的特定位置接连放上膜(2)和(4), 然后是膜(3)。覆盖了粘合剂的固相支持物(1)置于该机器的顶盖上, 粘性面朝向空气。闭合层压机, 将置于下面模型上的膜和粘性支持物接触; 通过真空泵抽气将膜严密固定就位。当真空停止时, 获得了包含固相支持物(1)和其上固定的膜(2)、(3)和(4)的卡片。

然后在膜(3)上沉积下列溶液: 近侧: 第一捕获物质; 1号带; 远侧: 第二捕获物质; 2号带。这些捕获物质用 Bio Dot 公司的 X-Y Platform Biojet Quanti-3000 型“分配器”沉积。

通过将整个卡片置于 60℃ 压力热空气中 1 分钟以迅速蒸发沉淀的溶液。

用切纸机类设备或旋转设备(可获自 Bio Dot、Kinematic 或 Akzo)将组装后的卡片切成长条。丢弃末端的长条, 其它长条备用。

图 1 说明了这种分析装置。

为了保存, 该分析装置置于含有干燥剂的不透光密封容器中(Air Sec, 法国)。

1.2.2. 第一捕获物质 - 参照抗生素。

在 25℃ 将 8ml 含有溶于碳酸钠缓冲液(100 mM, pH 9)的 213 mg 人丙种球蛋白(G4386, Sigma)和 8.6 mg 盐酸 2-亚氨基-硫杂戊环(Aldrich, 330S6-6)的溶液孵育 1 小时。

此外, 在 25℃ 将 20ml 含有溶于碳酸钠缓冲液(100 mM, pH 9)的 119.8 mg 头孢菌素 C 和 54 mg 磺基琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(sSMCC, 22322 Pierce)的溶液孵育 1 小时。

然后将上述制备的二溶液混合。加入 3ml NaH_2PO_4 (500 mM) 调节获得的溶液的 pH 值至 7.1, 将该溶液在 25℃ 孵育 2 小时。孵育后获得的混合物对 1 升磷酸钠缓冲液(10 mM, pH 7.5)透析 3 次。将获得的溶液通过 0.22 μm 过滤器过滤, 然后分成等分试样冻存于 -20℃ 直至使用。

使用时融化等分试样，向其中加入食品着色剂，然后将其沉积于膜上，以随时指示沉积物的确切位置和示踪物的量。

第一捕获物质可结合相对于样品中存在的抗生素的量而言过量的、与金颗粒偶联的 BlaR-CTD。

1.2.3. 第二捕获物质 - 能结合独立参照物的物质。

第二捕获物质可使用兔免疫球蛋白溶液 (Sigma I 5006)，在 10 mM 磷酸钠 (pH 7.5)、5mg/ml 人丙种球蛋白的缓冲液中的免疫球蛋白浓度为 0.5mg/ml。当液体沿分析装置迁移时，该第二捕获物质可使独立参照物停留。

1.3. 测定奶中的抗生素

1.3.1. 3分钟检验—快速检验

制备分别含有 0、1、2、3、4、5 和 6 ppb 青霉素 G 的 7 份鲜奶样品。然后以下列方式分析每一份溶液：

取 200ul 奶样品和 45.27ul 实施例 1.1.3 制备的溶液，放入玻璃瓶中。将该混合物在 47℃ 孵育 1 分钟。取一检验装置垂直放入该玻璃瓶中，使检验装置的第一端与混合物接触，并且第二端靠在玻璃瓶壁上。将该装置在 47℃ 孵育 2 分钟，让混合物在检验装置上迁移。

下面表 1 总结了这 7 个被测样品的结果。给被测条带确定一个范围从 0 到 10 的强度值，数值 10 是指最强的条带，数值 0 是指最弱的条带。根据该度量法，参照条带给出数值 6。第一条带中观察到的信号强度与样品中存在的青霉素 G 的量成反比。

表 1

<u>青霉素G</u> (ppb)	<u>强度</u>	
	<u>第一条带</u>	<u>第二条带</u>
0	10	6
1	9	6
2	9	6
3	4	6
4	0	6
5	0	6
6	0	6

在该实施例中，当第一条带的强度比第二条带的强度低时，检验被认为是阳性的。表 1 中的结果显示，该检验允许在 3 分钟内检测奶样品中低于 4ppb 的青霉素 G。

还在相同条件下对含有 β -内酰胺核的其它抗生素进行了检测。在 3 分钟内进行的该检验允许在奶样品中检测低至 5 ppb 的阿莫西林、低至 5 ppb 的氨苄青霉素、低于 10 ppb 的氯唑西林、低于 20 ppb 的双氯西林、低于 20 ppb 的苯唑西林、低至 20 ppb 的头孢匹林。

1.3.2. 5 分钟检验

制备 6 个分别含 0、2、4、6、8 和 10 ppb 氯唑西林的鲜奶样品。然后以下列方式分析每一个样品。

取 200ul 奶样品和 45.27ul 实施例 1.1.3 制备的溶液，置于玻璃瓶中。将该混合物于 47℃ 孵育 3 分钟。取一检验装置垂直置于玻璃瓶中，使该检验装置第一端与混合物接触，第二端靠在玻璃瓶壁上。将该装置在 47℃ 孵育 2 分钟，让混合物在检验装置上迁移。

下面的表 2 总结了这 6 个被测样品获得的结果。给被测条带确定一个范围从 0 到 10 的强度值，数值 10 是指最强的条带，数值 0 是指最弱的条带。根据该度量法，参照条带给出数值 6。第一条带中观察到的信号强度与样品中存在的氯唑西林的量成反比。

表 2

<u>氯唑西林</u> (ppb)	<u>强度</u>	
	<u>第一条带</u>	<u>第二条带</u>
0	10	6
2	6	6
4	5	6
6	3	6
8	3	6
10	3	6

在该实施例中，当第一条带的强度比第二条带的强度低时，检验被认为是阳性的。表 2 中的结果显示，该检验允许在 5 分钟内检测奶样品中低于 4 ppb 的氯唑西林。

还在相同条件下对含有 β -内酰胺核的其它抗生素进行了检测。在 5 分钟内进行的该检验允许在奶样品中检测低至 3 ppb 的青霉素 G、低至 4 ppb 的阿莫西林、低至 4 ppb 的氨苄青霉素、低至 8 ppb 的双氯西林、低至 8 ppb 的苯唑西林、低至 16 ppb 的头孢匹林、低至 100 ppb 的头孢噻吩、低于 20 ppb 的头孢唑肟、低至 20 ppb 的萘夫西林、低至 60 ppb 的头孢唑啉。

该检验特别适于在将运奶货车倒空至仓库之前作为分类检验。

1.3.3. 9分钟检验

制备 6 个分别含 0、4、6、8、10 和 12 ppb 头孢匹林的鲜奶样品。然后以下列方式分析每一个样品。

取 200ul 奶样品和 45.27ul 实施例 1.1.3 制备的溶液，置于玻璃瓶中。将该混合物于 47℃ 孵育 7 分钟。取一检验装置垂直置于玻璃瓶中，使该检验装置第一端与混合物接触，第二端靠在玻璃瓶壁上。将该装置在 47℃ 孵育 2 分钟，让混合物在检验装置上迁移。

下面的表 3 总结了这 6 个被测样品获得的结果。给被测条带确定一个范围从 0 到 10 的强度值，数值 10 是指最强的条带，数值 0 是指最弱

的条带。根据该度量法，参照条带给出数值 6。第一条带中观察到的信号强度与样品中存在的头孢匹林的量成反比。

表 3

头孢匹林 (ppb)	强度	
	第一条带	第二条带
0	10	6
4	6	6
6	5	6
8	4	6
10	3	6
12	3	6

在该实施例中，当第一条带的强度比第二条带的强度低时，检验被认为是阳性的。表 3 中的结果显示，该检验允许在 9 分钟内检测奶样品中低于 6 ppb 的头孢匹林。

还在相同条件下对含有 β -内酰胺核的其它抗生素进行了检测。在 9 分钟内进行的该检验允许在奶样品中检测低至 3 ppb 的青霉素 G、低至 4 ppb 的阿莫西林、低至 4 ppb 的氨苄青霉素、低至 4 ppb 的氯唑西林、低于 8 ppb 的双氯西林、低于 8 ppb 的苯唑西林、低至 80 ppb 的头孢噻唑、低于 20 ppb 的头孢唑肟、低于 20 ppb 的萘夫西林、低至 45 ppb 的头孢唑啉。

因此，在 9 分钟内进行的该检验允许检测所有欧洲政府当前控制的低至这些政府实行的法定极限的抗生素。

1.3.4. 20 分钟检验

制备 6 个分别含 0、20、30、40、50 和 60 ppb 头孢噻唑的鲜奶样品。然后以下列方式分析每一个样品。

取 200 μ l 奶样品和 45.27 μ l 实施例 1.1.3 制备的溶液，置于玻璃瓶中。将该混合物于 47 $^{\circ}$ C 孵育 18 分钟。取一检验装置垂直置于玻璃瓶中，

使该检验装置第一端与混合物接触，第二端靠在玻璃瓶壁上。将该装置在 47℃ 孵育 2 分钟，让混合物在检验装置上迁移。

下面的表 4 总结了这 6 个被测样品获得的结果。给被测条带确定一个范围从 0 到 10 的强度值，数值 10 是指最强的条带，数值 0 是指最弱的条带。根据该度量法，参照条带给出数值 6。第一条带中观察到的信号强度与样品中存在的头孢噻吩的量成反比。

表 4

<u>头孢噻吩</u> (ppb)	<u>强度</u>	
	<u>第一条带</u>	<u>第二条带</u>
0	10	6
20	6	6
30	5	6
40	4	6
50	3	6
60	3	6

在该实施例中，当第一条带的强度比第二条带的强度低时，检验被认为是阳性的。表中的结果显示，该检验允许在 20 分钟内检测奶样品中低于 30 ppb 的头孢噻吩。

因此，在 20 分钟内进行的该检验允许在单次检验中检测所有欧洲和美国政府当前控制的低至这些政府实行的法定极限的抗生素。

实施例 2. 测定奶中 6 种抗生素

该实施例阐述检测奶中美国政府控制的 6 种含有 β -内酰胺核的抗生素。该实施例所描述的检验使用与 β -内酰胺酶融合的融合蛋白形式的受体 BlaR-CTD，并使用磁珠形式的支持物。

2.1. BlaR-CTD- β -内酰胺酶融合蛋白。

BlaR-CTD- β -内酰胺酶融合蛋白通过受体 BlaR-CTD(B. Joris 等, FEMS Microbiology Letters, 107-114, 1990)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的 Zn β -内酰胺酶(M. Hussain 等, 1985, 细菌学杂志, 164:1, 223-229, 1985)之间的遗传偶联来获得。

偶联接按以下方式进行:

2.1.1. 质粒的构建:

在 BlaR-CTD 多肽和 β -内酰胺酶的两基因之间进行 1/1 的偶联: β -内酰胺酶编码基因按编码框导入在 BlaR-CTD 基因之后。携带该遗传融合物的质粒显示卡那霉素抗性。下文将融合蛋白称作 Fus 1。

2.1.2. 生产

- 菌株: 将携带该融合基因的质粒导入大肠杆菌。在 LB + Km(50 ug/ml) 中筛选携带重组质粒的克隆。
- 筛选: 用放射性抗生素标记细胞提取物, 之后变性聚丙烯酰胺凝胶电泳显示大部分该蛋白质以分子量约 50,000 的融合蛋白质形式产生。然而, 翻译后蛋白水解似乎将非常小比例(2%)的这些分子分解为两种不同的活性。
- 培养: 将储存于-70℃的重组细胞接种在 500ml LB+Km(50ug/ml) 培养基中。预培养物于 37℃ 225rpm 振荡培养过夜。用 600nm 光密度为 4 的该 500ml 预培养物接种 18 升 LB+Km(50ug/ml) 培养基。当该 18 升培养物的光密度值达到 6 时, 停止培养。

2.1.3. 抽提: 终止培养后, 立即过滤并离心细胞。在破碎仪中裂解细胞沉淀, 保留上清液。该上清液中含有融合蛋白 FUS1。

2.1.4. 纯化:

- 所用缓冲液:

- 缓冲液 A: 20mM pH8.0 Tris, 10% 1,2-乙二醇, 50um DTT;
- 缓冲液 B: 缓冲液 A + 1M NaCl。

通过离子层析和分子筛部分纯化该融合蛋白。抽提物沉积在 QSFF 柱 (Pharmacia, Upsala) 上, 以缓冲液 A 洗涤后, 用线性梯度的缓冲液 B 洗脱 FUS1。然后将活性部分 ($\pm 0.25M$ NaCl) 合并, 并沉积在 G-100 分

子筛 (Pharmacia, Upsala) 上; 用缓冲液 A 将其洗脱。回收部分的平均比活估计为 30%。

2.1.5. β -内酰胺酶的抑制:

融合蛋白 (9/10 体积) 与 50mM EDTA (1/10 体积) 于 37°C 孵育 45 分钟。使用溶于 10mM pH6.0 的二甲胍酸盐缓冲液的 nitrocefine 检验抑制情况。在存在或不存在 Zn 的情况下, 信号应分别是阳性或阴性的。抑制后, 基于 β -内酰胺酶活性测量的有效浓度是 7.74 pmol/ul。

2.2 固相支持物: 磁珠—头孢菌素 C (参照抗生素)。

使用 BioMag 4100 颗粒 (获自 DRG Instrument GmbH, Marburg, 德国, 货号 AM 4100 B), 其 NH_2 末端按如下方式以戊二醛活化:

- 一体积的 BioMag 4100 颗粒初始溶液用 5 体积的 0.01M pH6.0 嘧啶缓冲液漂洗 4 次。将这些颗粒悬浮在 2.5 体积的溶于嘧啶缓冲液的 5% 戊二醛中, 室温旋转搅拌 3 小时。然后, 用 2 体积的 0.01M pH7.0 Kpi 缓冲液洗涤 10 次。然后将该颗粒重悬在 1 体积的溶于 Kpi 缓冲液的 0.1M 头孢菌素 C 中, 4°C 旋转搅拌过夜。进行最终的洗涤直到头孢菌素 C 从 0.1M pH7.0 Kpi 缓冲液中完全除去。

2.3. 在奶中测定 6 种抗生素: 青霉素 G、氨苄青霉素、阿莫西林, 氯唑西林, 头孢匹林和头孢噻吩。

2.3.1. 所用的溶液:

- 溶液 1: 将在 100mM pH 8 Tris、1 mg/ml BSA、50 mM EDTA、50 μ M DTT 中冻干的 700 pmol 融合蛋白用 5ml Milli-Q 水重新水化; 进行一次测量需要 50ul 该溶液。
- 溶液 2: 2ml 实施例 1.2 中制备在 100% 异丙醇中的 BioMag-头孢菌素 C 颗粒; 进行一次测量需要 20ul。
- 溶液 3: 冻干的 10 mM, pH 6 二甲胍酸盐缓冲液和 1 M NaCl 用 500ml Milli-Q 水重新水化。
- 溶液 4: 400 ml 溶于 DMF 的 10 mM nitrocefine 用溶液 3 稀释至 40 ml;

每次检测需要 400ul.

2.3.2. 检测方法:

向 500ml 含添加物的奶样品中加入 50ul 溶液 1, 47℃ 孵育 2 分钟。将 20ul 溶液 2 悬浮在奶中, 47℃ 再孵育 2 分钟。使用顺磁磁铁将颗粒吸附在容器壁上, 将管中上清液倒出。用溶液 3 洗涤颗粒 2 次, 同时用磁铁进行相同的操作。最后, 加入 400ul 溶液 4, 与颗粒在 47℃ 孵育 3 分钟。然后, 测定 482nm 处残余溶液相对于 nitrocefine 溶液的吸光度。

该方法允许检测低于当局所实行标准浓度的美国法规给出的 6 种抗生素, 即 5ppb 青霉素、10 ppb 氨苄青霉素、10 ppb 阿莫西林、10 ppb 氯唑西林、20 ppb 头孢匹林和 50 ppb 头孢噻唑。

实施例 3. 测定奶中 3 种抗生素 (青霉素 G、氯唑西林、头孢噻唑)。

该实施例阐述在奶中检测卫生部门控制的含有 β -内酰胺核的 3 种抗生素。该实施例中所描述的检验使用分别与碱性磷酸酶和过氧化物酶融合的两融合蛋白形式的受体 BlaR-CTD, 并使用微量反应板形式的支持物。

3.1. BlaR-CTD-碱性磷酸酶融合蛋白。

通过受体 BlaR-CTD (B. Joris 等, FEMS Microbiology Letters, 107-114 (1990)) 和可获自 Boehringer-Mannheim Biochemica 的活化碱性磷酸酶 (货号 1464752) 之间的化学偶联, 获得 BlaR-CTD-碱性磷酸酶融合蛋白。

偶联接如下方式进行:

3.1.1. 偶联: BlaR-CTD 和碱性磷酸酶在 100 mM pH 9.8 碳酸钠/碳酸氢钠缓冲液中透析。15 nmol BlaR-CTD 与 100ul 活化的碱性磷酸酶 (20 mg/ml) 在 25℃ 孵育 2 小时。

3.1.2. 终止反应: 加入 40ul 2mM, pH 8 三乙醇胺溶液, 之后加入 50ul 200 mM 硼氢化钠溶液。混合物在 4℃ 孵育 30 分钟。然后加入 25ul 2 mM, pH 8

三乙醇胺溶液，将混合物在 4℃ 再孵育 2 小时。

3.1.3. 偶联的稳定化：加入 10ul 1M, pH 7.0 甘氨酸溶液。

3.1.4. 转移至储存缓冲液中：将反应混合物（约 300ul）在 4℃ 对 0.5 升 50 mM, pH7.6 三乙醇胺缓冲液，150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM ZnCl₂, 10 mM 甘氨酸透析三次，每次 8 小时。

3.1.5. 最终效价：偶联的最终效价为约每 μl 溶液 50 pmol 活性 BlaR-CTD。

3.2. BlaR-CTD-过氧化物酶融合蛋白

通过受体 BlaR-CTD (B. Joris 等, FEMS Microbiology Letters, 107-114 (1990)) 和可获自 Boehringer-Mannheim Biochemica 的活化过氧化物酶 (货号 1428861) 之间的化学偶联, 获得 BlaR-CTD-过氧化物酶融合蛋白。

偶联接如下方式进行:

3.2.1. 偶联: BlaR-CTD 和过氧化物酶在 100 mM pH 9.8 碳酸钠/碳酸氢钠缓冲液中透析。40 nmol BlaR-CTD 与 100ul 活化的过氧化物酶 (16 mg/ml) 在 25℃ 孵育 2 小时。

3.2.2. 终止反应: 加入 40ul 2mM, pH 8 三乙醇胺溶液, 之后加入 50ul 200 mM 硼氢化钠溶液。混合物在 4℃ 孵育 30 分钟。然后加入 25ul 2 mM, pH 8 三乙醇胺溶液, 将混合物在 4℃ 再孵育 2 小时。

3.2.3. 偶联的稳定化: 加入 10ul 1M, pH 7.0 甘氨酸溶液。

3.2.4. 转移至储存缓冲液中: 将反应混合物 (约 400ul) 在 4℃ 对 0.5 升 10 mM, pH7.5 磷酸钾缓冲液, 200mM NaCl, 10 mM 甘氨酸透析三次, 每次 8 小时。

3.2.5. 最终效价: 偶联的最终效价为约每 μl 溶液 100 pmol 活性 BlaR-CTD。

3.3. 固相支持物: 微量反应板-头孢菌素 C.

3.3.1. 制备参照抗生素溶液。

在 25℃ 将 8ml 含有溶于碳酸钠缓冲液 (100 mM, pH 9) 的 213 mg 人

丙种球蛋白 (G4386, Sigma) 和 8.6 mg 盐酸 2-亚氨基硫杂戊环 (Aldrich, 33056-6) 的溶液孵育 1 小时。

另外, 在 25℃ 将 20 ml 含有溶于碳酸钠缓冲液 (100 mM, pH 9) 的 119.8 mg 头孢菌素 C 和 54 mg 磺基琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺基甲基) 环己烷-1-羧酸酯 (sSMCC, 22322 Pierce) 的溶液孵育 1 小时。

然后, 将上述二溶液混合在一起。加入 3ml 500 mM NaH_2PO_4 , 调节所获溶液的 pH 值至 7.1, 混合物在 25℃ 孵育 2 小时。孵育后的混合物对 1 升磷酸钠缓冲液 (10 mM, pH 7.5) 透析三次。所获溶液通过 0.22 μm 滤器过滤。

3.3.2. 用参照抗生素包被微量反应板。

采用商品名为 NUNK (Immuno Plate: Maxisorp 型) 或商品名为 GREINER (microlon 600, 货号 705071) 的具有高蛋白吸附能力的聚苯乙烯微量反应板。用 150 mM, pH 7.2 PBS 洗涤微量反应板的小室。然后将实施例 3.3.1. 制备的等份溶液在小室中 4℃ 孵育 24 小时。孵育后用含有 0.1% Tween-20 的 150 mM, pH 7.2 PBS 缓冲液洗涤三次。然后在 20℃ 用含有 5% BSA 的 150 mM, pH 7.2 PBS 饱和缓冲液饱和该管 2 小时。用洗涤缓冲液洗涤三次后, 干燥该管并避潮保存于 4℃。

对用于 BlaR-CTD-碱性磷酸酶识别试剂的小室, 所用洗涤缓冲液是 1 M, pH 9.8 二乙醇胺, 0.5 mM MgCl_2 ; 对用于 BlaR-CTD-过氧化物酶识别试剂的小室, 所用洗涤缓冲液是 50 mM, pH 5 磷酸钾。

3.4. 测定奶中三种抗生素

将 1.4 pmol 的标记识别试剂与 100 μl 含添加物的奶在 47℃ 孵育 5 分钟。用加样器转移该奶至按实施例 2.3. 所示预处理的小室中。然后该奶在 47℃ 孵育 2 分钟。除去奶后, 用洗涤缓冲液洗涤两次 (参见实施例 2.3.2.), 在小室中加入含有显色底物的 300 μl 缓冲液, 孵育 2 分钟 (BlaR-CTD-过氧化物酶识别试剂的显色底物: 50 mM, pH 5 磷酸钾, 9.1 mM ABTS, 0.002% H_2O_2 ; BlaR-CTD-碱性磷酸酶识别试剂的显色底物: 1 M, pH 9.8 二乙醇胺, 0.5 mM MgCl_2 , 10 mM 4-NPP)。然后将该板置于 ELISA

板的自动分光光度计中，波长设定为 405nm。

该检验允许检测美国当局所要求的控制阈值以下的三种抗生素：青霉素 G、氯唑西林和头孢噻呋（青霉素 G 5 ppb、氯唑西林 10 ppb 和头孢噻呋 50 ppb）。

实施例 4. 测定奶中 6 种抗生素：青霉素 G、氨苄青霉素、阿莫西林、氯唑西林、头孢匹林和头孢噻呋。

该实施例阐述检测低至美国当局目前所要求标准的美国当局控制的含有 β -内酰胺核的 6 种抗生素。该实施例所描述的检验使用与碱性磷酸酶或过氧化物酶融合的融合蛋白形式的受体 BlaR-CTD，并使用包被的管子形式的支持物。

4. 1. BlaR-CTD-碱性磷酸酶融合蛋白。

见实施例 3. 1. .

4. 2. 固相支持物：用参照抗生素包被的管子

在本实施例中使用商品名为 NUNK (Maxisorp 型) 的具有高蛋白吸附能力的聚苯乙烯管，该管按实施例 3. 3. 2. 所示用参照抗生素溶液处理。

4. 3. 测定奶中 6 种抗生素。

在 Eppendorf 管中将 7 pmol 的识别试剂与 500ul 奶于 47℃ 孵育 5 分钟。然后用加样器转移该奶至按实施例 3. 2. 所示处理的管中。然后该奶在 47℃ 孵育 2 分钟。除去奶后，用 1 ml of 1 M pH 9.8 二乙醇胺缓冲液、0.5 mM $MgCl_2$ 洗涤该管两次。然后加入 500ul 含有 1 M pH 9.8 二乙醇胺、0.5 mM $MgCl_2$ 、10 mM 4-NPP 显色底物的缓冲液，将底物在 47℃ 孵育 2 分钟。然后用分光光度计测量上清液的吸光度，分光光度计波长设定为 405nm。

该检验允许检测低至美国当局所要求标准的六种抗生素：少于 5 ppb 青霉素 G；少于 10 ppb 氨苄青霉素；少于 10 ppb 阿莫西林；少于 10 ppb 氯唑西林；少于 20 ppb 头孢匹林；少于 50 ppb 头孢噻呋。

