

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/558

A23C 9/142 B32B 31/30



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98809987.X

[45] 授权公告日 2003 年 11 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1126956C

[22] 申请日 1998.10.6 [21] 申请号 98809987.X

[30] 优先权

[32] 1997.10.7 [33] BE [31] 9700807

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

[86] 国际申请 PCT/BE98/00147 1998.10.6

[87] 国际公布 WO99/18439 法 1999.4.15

[85] 进入国家阶段日期 2000.4.7

[71] 专利权人 UCB 公司

地址 比利时布鲁塞尔

[72] 发明人 J·德格拉恩 J-M·夫勒雷

B·格拉尼尔 B·卓伊斯

审查员 边 昕

[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

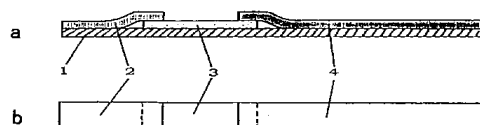
代理人 陈文平

权利要求书 3 页 说明书 24 页 附图 1 页

[54] 发明名称 检测液体奶制品中待分析物的试验
装置及方法

[57] 摘要

本发明涉及一种试验装置，它用于通过液体奶制品的毛细管迁移，检测液体奶制品中的待分析物，它包括一个有第一和第二末端的固体支持物(1)，在其上从第一末端开始连续固定有：纯化被分析的液体的膜(2)；在其上固定有一种或更多捕获物质的膜(3)；吸附膜(4)。本发明还涉及利用所述的试验装置和包括所述试验装置的试验试剂盒检测和定量液体奶制品中待分析物的方法。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1.一种通过奶制品的切向毛细管移动检测液体奶制品中待分析物存在的试验装置，其包括一个固体支持物（1），它有第一和第二末端，在其上从第一末端开始连续固定有下述的各种膜：

- 纯化被分析液体的膜(2)；
- 在其上固定有一种或多种捕获物质的膜（3）；
- 吸附膜（4），

其特征在于，在试验装置的第一末端被浸入待分析的奶制品中后，膜（2）可以滞留存在于奶制品中的一些物质，这些物质可阻止可能存在于奶制品中的待分析物和按具体方法使用的检测试剂在样品进行切向毛细管移动时在试验装置中的迁移，并且其中所述膜（2）由无纺聚酯纤维制成。

2.根据权利要求1的试验装置，其特征在于这些膜被一个粘性塑料薄膜（6）全部或部分覆盖。

3.根据权利要求2的试验装置，其特征在于这些膜被粘性塑料膜(6)部分覆盖。

4.根据权利要求1的试验装置，其特征在于膜（2）是Leukosorb®膜。

5.根据权利要求1的试验装置，其特征在于具有一个额外的膜（5），在其上沉积有至少一种检测试剂，膜（5）位于膜（3）之前。

6.根据权利要求5的试验装置，其特征在于这些膜被一个粘性塑料薄膜（6）全部或部分覆盖。

7.根据权利要求6的试验装置，其特征在于这些膜被塑料薄膜(6)部分覆盖。

8.根据权利要求1的试验装置，其特征在于它位于一个塑料盒内，在膜（2）的上面有一个盆状孔，在膜（3）的上面有一个窗状孔。

9.应用根据权利要求1的试验装置和检测试剂检测液体奶制品中的待分析物的方法，其包括如下步骤：

- a) 将一定体积的奶制品同本发明的试验装置相接触, 此接触发生在试验装置的第一个末端,
- b) 奶制品通过毛细管作用在试验装置中切向迁移, 使奶制品中可能存在的待分析物和检测试剂逐渐地通过膜(2)然后通过膜(3), 并且使未被膜(2)和膜(3)阻留的奶制品的组分终止于膜(4), 及
- c) 确定膜(3)上的固定物。

10. 根据权利要求9的方法, 其特征在于检测试剂包括至少一种能够特异性的识别待分析物或其类似物的物质和至少一种标记试剂。

11. 根据权利要求10的方法, 其特征在于至少一种能够特异性的识别待分析物或其类似物的物质与至少一种标记试剂偶联。

12. 根据权利要求10或11的方法, 其特征在于标记试剂是荧光的、颗粒性的、放射性的、发光的或酶性的。

13. 根据权利要求9的方法, 其特征在于在步骤a)之前, 至少加入一种检测试剂。

14. 根据权利要求13的方法, 其特征在于在步骤a)之前准备的混合液被保持在孵育条件下, 使一种检测试剂与待分析物或其类似物形成一种稳定的基本不可逆的复合物。

15. 根据权利要求9的方法, 其特征在于检测试剂中还额外包括至少一种参照物质。

16. 根据权利要求9的方法, 其特征在于待分析物是四环素类, 如四环素、氧四环素或氯四环素。

17. 根据权利要求9的方法, 其特征在于待分析物是液体奶制品的外源性蛋白, 如外来蛋白; 或是奶制品的内源性蛋白, 如孕激素和生长激素等激素。

18. 根据权利要求9的方法, 其特征在于待分析物是一种 β 内酰胺环抗生素。

19. 根据权利要求9的方法, 其特征在于待分析物选自: 苄基青霉素、氨苄青霉素、羟氨苄青霉素、羧苄青霉素、methycillin、邻氯青霉素、6-APA、单内酰胺抗生素、氨曲南、美西林、头孢氨苄、头孢来星、头

孢噻啉、头孢硝噻吩、头孢噻肟、头孢呋新、头孢噻夫、头孢匹林、7-ACA。

20. 根据权利要求10的方法，其特征在于能够特异性的识别待分析物或其类似物的物质选自：能够特异性的与待分析物或其类似物形成稳定的基本不可逆复合物的受体，和对待分析物或其类似物特异的单克隆或多克隆抗体。

21. 根据权利要求20的方法，其特征在于特异性的识别待分析物或其类似物的物质是从抗生素敏感性微生物获得的受体，如从杆菌属、链球菌属或放线菌属的种类获得的受体。

22. 根据权利要求20或21的方法，其特征在于特异性的识别待分析物或其类似物的物质是从地衣型芽孢杆菌获得的对 β 内酰胺环抗生素敏感的受体。

23. 根据权利要求22的方法，其特征在于从地衣型芽孢杆菌中得到的对 β 内酰胺环抗生素敏感的受体是BlaR或BLAR-CTD受体。

24. 用于检测液体奶制品中的分析物的分析装置的制备方法，该方法包括：

(a) 在具有第一末端和第二末端的固体载体上，从第一末端开始，相继固定下述膜(i) - (iii)：

(i) 纯化膜，它可以滞留干扰物质，并允许液体奶制品中的分析物和检测试剂通过切向毛细管迁移作用，从所述固体载体的第一末端向第二末端迁移，同时在所述迁移过程中保持分析物和检测试剂的活性，所述干扰物质是阻碍这种迁移的物质，所述纯化膜由无纺聚酯纤维制成，

(ii) 固定化膜，和

(iii) 吸吸膜，及

(b) 沉积一种或多种捕获物质到固定化膜上。

25. 包含权利要求1的试验装置的试验试剂盒。

检测液体奶制品中待分析物的试验装置及方法

本发明涉及一种检测如牛奶等液体奶制品中的待分析物的试验装置。还涉及利用该试验装置检测和定量分析牛奶中待分析物的一种检验方法，以及包含该试验装置的试验试剂盒。

目前，许多国家的卫生规定要求必须常规监测奶制品中存在的各种物质，如在奶牛饲养中常应用的兽医药物和激素。由于显而易见的医学上的原因，在人类消费的奶制品中必须去除这些物质。

在另一些情况下，为了使奶牛的饲养最佳化，迫切需要进行能够检测到牛奶中存在的内源性物质的试验方法。尤其是迅速检测牛奶中激素的水平，可容易地确定奶牛繁殖的最佳时期。

还有一些情况下，需要有可靠和有效的方法来检测来自各种动物的奶制品的来源，因而需要有一种方法，以鉴定某种动物的奶液中存在的特征性蛋白（相对于其它动物）。

在文献中，介绍了检测各种生物体体液中的物质的方法，这些检测通常是应用了使用一种识别剂（受体或抗体）的检测方法，这些识别剂可以特异性的识别待分析物或其类似物，和一种标记试剂（放射性元素、酶、荧光试剂等），这些试剂在下文中称作检测试剂。依据被选择的检测试剂的不同，有放射免疫分析（RIA）、放射受体分析（RRA）、酶免疫分析（EIA）等方法。一般原则是这些检测使用两种上面提到的元件（检测试剂）的最小组合，以得到其值可表明存在待分析物的量的结果为准。

应该指出的是，根据选择的检测方法的不同，标记物可以与识别试剂或与待分析物或待分析物类似物（就其被识别试剂的识别而言）偶联。还有的方法中，识别试剂或待分析物或待分析物类似物含有内在的标记物（例如，放射性标记的待分析物）。

对奶制品来说，被最广泛提及的待分析物检测是关于抗生素的检

测。实际上，应用抗生素治疗奶牛的某些感染性疾病是众所周知的。

然而，由于医学上显而易见的原因，原则上，用于人类消费的奶制品一定不能有任何抗生素的痕迹。而且，0.005 I.U./ml或更少浓度的青霉素在奶酪、酸奶酪等牛奶制品的加工时具有有害的影响。

我们可以设想很多种情况，例如在农场，在运送到卡车上之前进行检测抗生素存在的检验时，将优先选择非常快速（少于5分钟）简便的检测方法。我们还可以设想在另一种情况下这种快速检测的应用，如当已知曾被用于治疗抗生素时，这种检测允许检测被怀疑的抗生素是否符合标准。在第二个例子中，当重点不放在快速性上时，重要的是检测大部分（即使不是全部）的抗生素是否符合法定标准。

其理由是，在某些国家的法规要求非常具体的质量标准。例如，美国政府要求牛奶中如下的六种抗生素的浓度不能超过特定的值：青霉素，5ppb；氨苄青霉素，10ppb；羟氨苄青霉素，100ppb；邻氯青霉素，10ppb；头孢吡林，20ppb；头孢噻夫，50ppb。欧盟也有质量标准（部分），青霉素，4ppb；氨苄青霉素，4ppb；羟氨苄青霉素，4ppb；邻氯青霉素，30ppb；双氯青霉素，30ppb；苯唑西林，30ppb；头孢吡林，10ppb；头孢噻夫，100ppb；头孢苯醌，20ppb；萘夫西林，30ppb；头孢唑啉，50ppb。

因而，拥有一种允许检测大部分待测抗生素的检测方法可能是有利的。而且，在奶制品工业中，由于缺少一种同时具有快速性、敏感性、简便性的检测方法，认为拥有上述三个特性的最佳组合，即使是它们未被全部含盖，也是有利的。

美国专利4,239,852描述了一个检测牛奶中 β 内酰胺环抗生素的微生物方法。按照这种方法，先在有对抗生素高度敏感微生物（尤其是脂肪嗜热杆菌）的细胞部分存在的条件下孵育奶样品，再在用放射活性元素或酶标记的抗生素存在下孵育。孵育的条件是允许抗生素（样品中如果存在）和标记的抗生素同细胞部分结合。

孵育之后，从混合物中分离细胞部分并洗涤，随后，检测同细胞部分结合的标记抗生素的量并同标准进行比较。同细胞部分结合的标

记抗生素的量与分析的奶样品中存在的抗生素的量成反比。

这个方法需要相当细致的操作，尤其是在分离细胞部分的阶段。另外，这种方法在用放射活性元素（ ^{14}C 和 ^{125}I ）标记的抗生素时最敏感，在这种情况下，在测定奶样品中抗生素存在的量时必须应用特殊的仪器，如闪烁记数仪。另外，即使是很少量的放射活性物质，对进行分析操作的人来说也不是完全没有危险的。

欧洲专利申请593112描述了另一种检测牛奶中抗生素的方法，这种方法应用了从一种抗生素敏感的微生物（如脂肪嗜热杆菌）中分离的蛋白质，这种蛋白质用如过氧化物酶等酶进行标记。

该检测按如下步骤进行：奶样品在有标记蛋白质存在的试管中孵育，孵育后，将奶液转移至第二个试管中，在其壁上固定有参照抗生素，再进行孵育，弃去试管中的内容物，用洗涤溶液洗涤试管壁三次，弃去洗涤液，然后将试管壁上的残留物转移到吸附纸上，将产颜色的底物加入到试管中，并进行孵育，加入阻止颜色产生的溶液；将试管的颜色与同时进行测试的标准抗生素样品的平行管进行比较。被固定在支持物上的标记蛋白质的量及颜色的强度与被检测的奶样品中存在的抗生素成反比。

根据该专利申请的实施例1，这种试验可检测浓度低至5ppb的青霉素，并可检测羧苄青霉素（5ppb）、氨苄西林（10ppb）、头孢吡林（5ppb）、头孢噻夫（5ppb）。

然而，这种检验进行起来操作非常繁琐，尤其对于不熟练的工作人员来说。实际上，这种检验包含了许多步骤，包括许多从一个容器将液体和残留物转移到另一容器的步骤及许多洗涤的步骤。在该测试中需要一定数目和种类的步骤，要得到可靠的结果很大程度上依赖于实验操作的技能。

另外，解释实验结果需要两个平行进行的检测，因而使操作进一步复杂化。

还公开了另外一些酶方法，使得可以检测牛奶中低浓度的抗生素（J.M. Frere等，抗微生物剂和化疗（Antimicrobial Agents and

Chemotherapy), 18(4), 506-510 (1980), 和 EP85 667 及 EP468 946), 它们是以应用特异性的酶即可溶性细胞外 D-丙氨酰-D 丙氨酸羧肽酶为基础的, 这种酶是有足肿放线菌 R39 产生的 (在下文中称为“酶 R39”)。酶 R39 具有特异性的水解各种多肽链中 D-丙氨酰-D 丙氨酸基团的活性和水解某些硫代酯的活性。

另外, 酶 R39 与含有 β 内酰胺环的抗生素反应迅速形成等摩尔酶-抗生素复合物, 它是无活性的并且是不可逆的。

在这种检测的最近的实施方法 (EP468 946) 中, 将预定体积的待检测液体样品与一定量的酶 R39 在一定条件下进行孵育, 这种条件应当允许在样品中可能存在的 β 内酰胺环抗生素与酶反应, 形成等摩尔无活性的、不可逆的酶-抗生素复合物。

随后, 用预定量的硫代酯型底物和第一阶段反应的产物在一定条件下进行孵育, 这种条件应当允许底物被第一次孵育时未与抗生素形成复合物的酶 R39 水解。加入可与游离巯基烷酸反应生成带颜色物质的试剂, 用比色分析的方法测定形成的巯基烷酸的量。颜色的强度与事先用含已知浓度抗生素的样品建立的标准进行比较, 用分光光度计可进行定量测定, 在检测牛奶时, 事先纯化样品是必须的。

显而易见, 相对于 EP 专利申请书 539 112 来说, 这种检测方法包含的步骤更少操作也更简便。然而, 它仅限于检测带有 β 内酰胺环的抗生素, 并且检测的阈值受酶 R39 的限制。所以, 该检测不能用于其它抗生素受体的检测, 也不能直接用于牛奶中其它待分析物检测的基础。

目前的检测方法仍有各种缺点, 申请人的目的是寻找一种新的检测液体奶制品中待待分析物的方法, 这种方法可以可靠地、优选地在农场收集奶时检测各种类型的待分析物。申请人寻求一种在有限的步骤之内非常迅速地得到可靠及敏感的结果的检测方法, 它不需要任何特殊的实验技能。另外, 申请人寻求一种可以轻松地用视觉测定结果的方法, 而且它也可以用仪器测量的方法定量。

申请人现在已经发现, 借助一种新颖的试验装置, 这些目标是可

以达到的，它使得容易测定液体奶制品尤其是牛奶中的待分析物的存在。

因而本发明提供了一种允许通过奶制品的切向毛细管迁移检测所述液体奶制品中待分析物存在的方法。依据本发明，该试验装置包括一个固体支持物（1）它有第一和第二末端，在其上从第一末端开始连续固定有：

- 纯化被分析液体的膜(2)；
- 在其上固定有一种或多种捕获物质的膜（3）；和
- 吸附膜（4），

其特征在于，在试验装置的第一末端浸入待分析的奶制品中之后，膜（2）可以滞留存在于奶制品中的一些物质，这些物质可妨碍可能存在于奶制品中的待分析物和相应的检测试剂在样品进行切向毛细管移动时，在试验装置中的迁移。

根据本发明的一个具体实施方案，该试验装置还有一个膜（5），在其上至少沉积有一种检测试剂，该检测试剂可以迅速溶解于上述的奶制品中。根据这个具体实施方案，膜（5）必须置于膜（3）之前，例如，它可以置于装置的第一末端上膜（2）的前面，或者膜（2）和膜（3）之间，或者膜（2）之上或之下。

本发明装置中的各种膜在它们的末端是相互相连的，以确保奶制品从一个带到另一个带的连续迁移。膜（3）的近端在膜（2）下，远端在膜（4）之下。可任选性地借助一个粘性塑料薄膜保持一个膜与另一个膜的接触，在这种情况下，选择粘性塑料薄膜时应使其不影响液体在试验装置中的迁移。

选择用粘性塑料薄膜覆盖试验装置有两个优点：它确保膜间在相连点完美的接触，并且构成了一个保护薄膜。粘性塑料薄膜（6）既可完全覆盖膜（2）（3）（4）和（5），也可部分覆盖单个的膜。优选的是，为了使液体更迅速的移动过试验装置的膜（2），粘性塑料薄膜（6）并不覆盖第一末端开始的几毫米。

图1到图3说明了本发明试验装置的例子。图1a、2和3显示了正视

图，图1b显示了纵剖面图。

本发明的试验装置的固体支持物(1)是由玻璃或塑料构成，优选是塑料。在由塑料构成的支持物中，它的厚度通常在0.05到1毫米之间，优选是在0.1到0.6毫米之间。这些膜通过粘合剂固定在固体支持物(1)上。

膜(2)可以是各种类型，一方面，它必须可以滞留存在于奶制品中这样一些物质，在样品进行切向毛细管移动时，这些物质可阻止可能存在于奶制品中的待分析物和相应的检测试剂在试验装置中的迁移。另一方面，它必须允许待分析物和检测试剂在试验装置中的迅速迁移，而且在迁移中保持这些待分析物和检测试剂的活性。能用于本发明的非限制的实例是Cytosep1663和Leukosorb LK4(可从Pall Gelman Sciences得到)、GF/D、GF/DVA、17 CHR(可从Whatmann得到)及GF141类型的玻璃纤维(可从Alstrom得到)。

优选使用的Leukosorb膜是由无纺聚酯纤维制成的，它用来滞留血液、尿、唾液和脑脊液等临床样品中的白细胞。白细胞的滞留是经通过横穿过膜的液体的过滤实现的。

出乎意料，申请人发现这些类型的膜为借助本发明的试验装置在奶制品中待分析物的检测提供了一个非常重要的功能，即滞留奶制品中~~在奶制品在试验装置中进行切向毛细管迅速迁移时~~可阻止试验的正确运行的物质，而允许待分析物和检测试剂的快速迁移。

为了使这一功能发挥最佳效果，膜(2)必须足够长，允许排除奶制品中所有的阻止待分析物和检测试剂在试验装置中迁移的物质。

膜(3)必须可以固定一种或多种捕获物质，并且必须允许奶制品样品在通过膜(2)后迅速迁移。优选该膜固定在聚酯型的非多孔支持物上。根据本发明，适合的非限制的实例是具有高毛细管速度的硝酸纤维素膜，例如高流膜(Hi Flow)(可从Millipore得到)，最好是SX或ST型高流膜(Hi Flow)。这些膜同上述的膜(2)结合应用时，可提供最佳的结果。

一种或多种捕获物质被固定于膜(3)上。当然，被固定的捕获物

质的类型取决于检测待分析物时实行的方法；捕获物质能够选择性的固定至少一种在试验装置中迁移的液体的成分，例如一种检测试剂，或者是与待分析物之间形成的复合物，或者是该待分析物的类似物，或者是至少一种检测试剂，或者是两个或更多检测试剂形成的复合物。捕获物质也可以是一种检测试剂。捕获物质以集中的形式固定于膜（3）的一部分或几个选定好的部分，例如圆盘或窄带，或任何适合于应用的其他设计。无论选择什么设计，它必须允许清晰的读出结果。

就其大小而言，膜（3）必须足够长，以包含按实际检测方法所要求顺序和量使用的所有捕获物质。

在液体通过前面的膜之后，只要膜（4）能够吸收并保留液体，那么用作膜（4）的膜类型的重要性较小。膜（4）要足够大以使它吸收通过膜（3）的液体，而且从实用的角度来看，要使试验装置的操作更容易。

本发明的试验装置还可以包括一个膜（5），其上沉积有至少一种检测试剂。膜（5）必须允许奶制品的迁移，而且同时允许奶制品流过时溶解和释放检测试剂（或多种试剂）。符合这个目的的膜的非限制性实例是：玻璃纤维树脂为基础的膜，例如T5NM膜（可从Millipore得到），F057-14或F057-17或GF/C膜（可从Whatman得到），膜Cytosep 1663（可从Pall Gelman Science得到）；聚酯纤维树脂为基础的膜，例如Accuwick膜（可从Pall Gelman Science得到），3mm纤维素纸（可从Whatman得到），Release Matrix PT-R2型的膜（可从Advances Micro Devices得到）。最好应用聚酯纤维树脂为基础的膜，如Accuwick膜。膜（5）要足够长以支持检测试剂的所需量。

本发明的试验装置是用本领域技术人员已知的方法制造的。例如，检测卡可以用市售的压层薄板制成。在检测卡组装之前或之后，所用的捕获物质以溶液的形式沉积于膜（3）上，这些溶液用市售的仪器可以被非常精确地沉积于膜（3）上，例如BioDot公司的Biojet Quanti-3000 X-Y平台分配器。将这些被沉积的溶液迅速蒸发，例如将

检测卡置于热气流之下。对大量生产而言，这些检测卡还可以制成卷轴。随后，将负荷有所要求的捕获物质的检测卡或卷轴切割成条带，每一个条带均构成一个本发明的试验装置。

当试验装置包括膜（5）时，在组装检测卡之前，简单地将膜（5）浸润于含有检测试剂的溶液中，可使检测试剂沉积于膜（5）上。还可以在检测卡或卷轴组装之后，用与在膜（3）上沉积捕获物质相似的技术沉积检测试剂于膜（5）上。

在本发明的一个变化方案中，将试验装置置于一个塑料盒中，该塑料盒有两个孔：第一个孔呈盆状，位于膜（2）之上，允许接受被检测的液体；第二个孔是一个窗状孔，可观察到膜（3）上的结果。在这种情况下，试验装置不包括粘性塑料薄膜（6）。

本发明的试验装置可检测在液体奶制品尤其是牛奶中存在的待分析物。

因而，本发明同时还提供了一个利用本发明的试验装置和检测试剂，检测液体奶制品中待分析物的检验方法，它包括以下的步骤：

- 1) 将一定体积的奶制品同本发明的试验装置相接触，此接触发生在试验装置的第一个末端，
- 2) 奶制品通过毛细管作用在试验装置中切向迁移，使奶制品中可能存在的待分析物和检测试剂逐渐地通过膜（2）和膜（3），并且使未被膜（2）和膜（3）阻留的奶制品的组分终止于膜（4），和
- 3) 确定膜（3）上的固定物。

本发明的方法可检测液体奶制品中的待分析物，如牛奶、乳清、用搅拌器搅拌过的牛奶等。本发明尤其适用于检测牛奶中可能存在的兽医学药物、激素或蛋白。

根据本发明的实施方式（起本身是基于实际的检测方法），本发明检测方法中使用的检测试剂在数量上和性质上是可以变化的。该方法至少使用两种检测试剂，第一种检测试剂是识别试剂，具有特异性识别待分析物的功能，在下文中称为“鉴别剂”。第二种检测试剂是标记试剂，在下文中称为“标志剂”。应该指出的是，根据被选择的

实施方式的不同，某种检测试剂可以存在于膜（3）上或者是膜（5）上。依据被检测的待分析物和应用的检测试剂，在将奶制品与试验装置接触的步骤之前，可能需要加入一种或多种检测试剂，并保持这种混合物于允许检测试剂和待分析物或其类似物之间形成复合物的孵育条件下。依据所选择的方法，鉴别剂和标志剂可以是相互偶联的或者是独立的物质。另一方面，可以有多种鉴别剂和/或标志剂。

借助鉴别剂可特异性识别待分析物或其类似物的功能，鉴别剂可以检测所要寻找的某种类型的待分析物的存在。它可以是可以与待分析物或其类似物形成牢固的不可逆的复合物的受体；或者是待分析物或其类似物特异的单克隆或多克隆抗体。对检测抗生素而言，鉴别剂可以从特异性单克隆或多克隆抗体中选择，也可以从对抗生素敏感的微生物中制备的受体中选择，例如，从芽孢杆菌属（脂肪嗜热芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣型芽孢杆菌等）、链球菌属（嗜热链球菌等）或放线菌属（足肿放线菌 R39等）中制备的受体。

根据本发明的一个优选实施方案，应用的鉴别剂包括对 β 内酰胺环抗生素敏感的受体，该受体是从地衣型芽孢杆菌中分离的，例如受体BlaR或受体BlaR-CTD。蛋白BlaR的分离和肽链的序列在“Y.Zhu等，细菌学杂志(J.Bacteriol.), 1137-1141(1990)”中有描述。受体BlaR-CTD是BlaR的羧基末端区域，它的分离和肽链序列在“B.Joris等，FEMS Microbiology Letters, 107-114 (1990)”中有描述。

根据本发明，为检测 β 内酰胺环抗生素而应用的受体BlaR或BlaR-CTD较当前应用的识别试剂有较大的优点。实际上，受体BlaR或BlaR-CTD能够非常迅速地与许多抗生素形成复合物，并且在孵育温度下即可完成，低于已知识别剂需要的温度，后者如从脂肪嗜热杆菌中制备的受体。

应用的第二种检测试剂是标志剂，它可以使奶制品中存在的待分析物可见，并且可直接或间接地定量。应用的标志剂可以是颗粒状的、发荧光的、放射性的发光的或酶性的。优选颗粒状的标志剂，即使存在的量小，它也可给出容易检测的、可见的信号。一些非限定性

实例是，胶状金属粒子（铂、金、银等），硒、碲、硫、碲的胶状粒子，或者胶乳的带色的、合成的胶状粒子。直径在1到60mm之间的胶状金粒子尤其适合，可给出容易检测的强粉红色信号。

借助标志剂与一种或更多的检测试剂、待分析物或其类似物的偶联，标志剂可以检测奶制品样品中存在的待分析物。

标志剂与检测试剂的偶联可按照本领域技术人员已知的方法进行。当使用具体的标志剂时，标记既可以通过吸收直接在粒子上进行，也可以间接地通过化学锚定臂进行，如生物素/抗生物素复合物。该偶联过程既可发生在奶制品与试验装置接触阶段之前，也可以发生在奶制品在试验装置中迁移时。

根据本发明的一个具体实施方案，应用第三种检测试剂，在下文中称为“参照物”。将已知量的该参照物加入到被分析的样品中，其固定于固定在膜（3）上的特异的捕获物质上。参照物可以给出一条带，它的强度可作为待分析物定量的参照。

至于奶制品与试验装置相接触所涉及的操作（检测方法的步骤a）），是将试验装置置于一个在其底部有被分析样品的容器内，试验装置基本垂直置于容器内，使其第一末端与混合液接触。

在本发明的一个变化方案中，将试验装置置于一个塑料盒中，这个盒子是水平放置的，接触是通过将一份被分析样品置于位于膜（2）上的盆形孔中进行的。

在迁移步骤b）中，通过毛细管作用使液体在试验装置中迁移。通过毛细管作用在试验装置中迁移的液体首先遇到膜（2），它可滞留奶制品中的一些物质，这些物质可阻止可能存在于奶制品中的待分析物和检测试剂在试验装置中的迁移。待分析物和检测试剂随后迁移过在其上固定有一种或多种捕获物质的膜（3）。捕获物质选择性地固定至少一种存在于被分析液体中的组分。本发明的一个具体实施方案中，使用这样一种捕获物质，它被置于液体迁移经过膜（3）的路途末端，它能够固定所有的未被前面的捕获物质滞留的标志剂，该捕获物质能补充由前面的捕获物质提供的定量信息。

确定膜(3)上的固定物(检测方法的步骤c)),是简单地通过测定带中标志物的存在实现的。简单的情况中,该检测可能是直观的。然而,如果想精确地测量观察信号的强度,可使用一个能够测量观察信号强度的仪器。当应用了一种参照物时,它被一种特异性的捕获物质固定,可为测量观察信号的强度提供内参照。

所获结果的解释取决于实际的检测方法,即取决于使用的检测试剂和捕获物质。

相对于在以前的文献中已经描述的检测牛奶中待分析物的方法,本发明的检测方法有以下的优点。首先,该方法非常快速并且执行起来非常简单:它基本包括两个容易的操作步骤,不需要特殊的实验技术。其次,结果的定量和定性评估是非常迅速的,并且不需要特殊的额外操作,如当用染料和/或酶标志剂的方法进行检测时需要的那些操作。另外,该检验方法可以直接被用来检测不同类型的待分析物。最后,在应用参照物的方法中,结果可被直接定量和解释,不需要进行一个或更多的参照试验。

本发明还提供了一种用于奶制品中待分析物检测的试验试剂盒,其包含本发明的试验装置。如果适当,本发明的试验试剂盒除了样品外,还可能包括用于在奶制品与试验装置接触前加入样品的检测试剂。

如下的实施例举例说明了本发明的各个方面和实施方案,但并不限制它的范围。

实施例1. 试验装置的制造。一般过程。

1.1 膜卡片的组装。

用Clamshell层压型层压片(BioDot, Inc.提供),按如下的方法首先组装尺寸为 300×72.2 mm的检测卡。

切割出大小为 300×76.2 mm的ArCare 8565型(可从Adhesive Research得到)长方形塑料支持物(固体支持物(1))。随后,切割大小为 300×20 mm长方形Leukosorb LK4膜(Pall Gelman Science提

供) (膜(2)); 切割 $300 \times 25\text{mm}$ 的长方形Hi-Flow SX膜(Millipore提供)(膜(3)); 切割 $300 \times 40\text{mm}$ 的长方形3mm纤维素膜(可从Whatman得到)(膜(4))和裁剪 $300 \times 0.8\text{mm}$ 的长方形Accuwick膜(Pall Gelman Science提供)(膜(5))。

接下来, 将膜(2)和膜(4)、膜(3)和膜(5)按次序放置于层压机的低层模具的特定位置, 被胶粘剂覆盖的固体支持物(1)的一部分被仪器的盖夹住, 胶粘剂的面暴露于空气中。通过关闭层压机, 放置于低层模具的膜与粘性支持物相接触; 通过用真空泵吸空气的方式, 使这些膜处于恰当的位置。当真空被破除时, 即可得到在其上固定有膜(2)、膜(3)、膜(4)和膜(5)的固体支持物(1)。

1.2 在膜(3)上沉积捕获物质

在膜(3)上沉积捕获物质是在按照实施例1.1组装之前或之后进行的。

准备一含有捕获物质的水溶液, 用BioDot公司的BioJet X-Y Platform Quanti-3000分配器, 将它沉积于在实施例1.1中制备的膜卡片中的膜(3)上。

将整个卡片置于 60°C 的热脉冲空气流中一分钟, 使沉积的溶液迅速蒸发。

1.3 将标记物质沉积到膜(5)上

a) 在按照实施例1.1组装之前

准备一含有标记物质的水溶液, 将膜(5)侵入此溶液中, 随后排出水分, 在0.5巴的真空条件下, 于环境温度中干燥过夜。

b) 在按照实施例1.1组装后

按实施例1.2中叙述的沉积捕获物质的步骤进行。

1.4 放置粘性塑料薄膜(6)

切割长方形的ArCare 7759型粘性薄膜(可从Adhesive Rresearch得到), 得大小为 $300 \times 20\text{mm}$ 的薄膜, 用于部分覆盖; 大小为 $300 \times 71.2\text{mm}$ 的薄膜用于覆盖全部的膜。

将按照实施例1.1得到的卡片放置于层压机的底层模具，粘性薄膜被放置于层压机的盖上，其粘性面暴露于空气中。当机器被关上时，粘性塑料薄膜即可与膜卡片接触。

1.5 剪成条带

用环刀型剪断机或旋转型仪器（可从BioDot, Kinematic 或Akzo得到）将组装后的检测卡切割成带状，弃去碎条，其他条带备用。

为了保存它们，将试验装置置于一个有干燥剂（法国，Silgelac）的不透明的密封容器内。

1.6 装于塑料盒中

将试验装置置于一个塑料盒子中，此盒子有两个开口：第一个是盆状的，位于膜（2）之上，并可接受被检测的液体；第二个是窗孔状的，可显现膜（3）上的结果。

实施例2 用酶R39检测牛奶中的 β 内酰胺环抗生素

2.1 鉴别剂

在这个实施例中应用的鉴别剂是由足肿放线菌R39产生的可溶性细胞外D-丙氨酰-D丙氨酸羧肽酶，通过“J-M. Frere 等，抗微生物剂和化疗, 18(4), 506-510 (1980)”中介绍的方法制备。

2.2. 鉴别剂与标志剂的偶联

2.2.1 鉴别剂的生物素化

用 500m1 HNM 缓冲液（Hepes 10 mM, pH 8, NaCl 10mM, MgCl₂ 5mM）透析浓度为 1mg/ml 的 250 μ l 酶 R39 的水溶液 24 小时。向透析后的酶 R39 溶液中加入 2ml 碳酸氢盐缓冲液 (0.1M 碳酸氢钠, pH 9) 和 250 μ l N-羧基琥珀酰亚胺 6-（生物素酰胺）己酸酯，后者溶于无水 DMF 中，浓度为 5mg/ml。在室温和避光的条件下，在 LABINCO 搅动机（比利时 VEL 提供）中试管在旋转轴上以 2 转/分钟的速率轻轻搅动此溶液 3 小时。后将此溶液用 HNM 缓冲液（Hepes 10 mM, pH 8, NaCl 100mM, MgCl₂ 50mM）透析 24 小时。通过此方法得到了生物素化的酶 R39，用 HNM-SBA 缓冲液（Hepes 500 mM, pH 8, NaCl

500mM, MgCl₂ 250mM, BAS 10mg/ml) 将其稀释, 终浓度为100 μg 酶R39/ml缓冲液, 置于-20℃备用。

2.2.2 标志剂

作为标志剂, 使用直径为40nm的金颗粒, 在其上沉积有羊抗生物素抗体, 为在pH为7.2的2mM四硼酸钠水溶液中的悬浮液形式, 由0.1%的叠氮化钠 (British Biocell(Ref.GAB40)提供) 稳定化。这些悬浮液在520nm处的光密度大约为10, 蛋白的浓度大约为24 μg/ml。

2.2.3 生物素化的鉴别剂与标志剂的偶联

用于快速检测的溶液A

在实施例2.2.1中制备的生物素化的酶R39溶液用HNM-SBA缓冲液 (Hepes 500 mM, pH 8, NaCl 500mM, MgCl₂250mM, BAS 10mg/ml) 稀释25倍。在室温下, 将17.5体积份的稀释的生物素化酶R39溶液、9.27体积份的用于标记酶R39的金颗粒悬浮液和6体积份的参照物金颗粒悬浮液混合 (见实施例2.3)。

用于敏感试验的溶液B

在实施例2.2.1中制备的生物素化酶R39溶液用HNM-SBA缓冲液 (Hepes 500 mM, pH 8, NaCl 500mM, MgCl₂250mM, BAS 10mg/ml) 稀释50倍。在室温下, 将17.5体积份的稀释的生物素化酶R39溶液、9.27体积份的用于标记酶R39的金颗粒悬浮液和6体积份的参照物金颗粒悬浮液混合 (见实施例2.3)。

2.3 参照物

使用的参照物是直径为40nm的金颗粒, 在其上沉积有羊抗兔免疫球蛋白抗体。这些颗粒可从British Biocell(Ref.GAB40)得到, 在pH为7.2的2mM四硼酸钠水溶液中呈悬浮液形式, 由0.1%的叠氮化钠稳定化。这些悬浮液在520nm处的光密度大约为3, 蛋白的浓度大约为6 μg/ml。

2.4 捕获物质

2.4.1 第一捕获物质

取8ml在碳酸钠缓冲液 (100mM, pH 9) 中含有213mg人 γ 球蛋白

(G4386, Sigma) 和 8.6mg 盐酸 2-亚氨基硫杂环戊烷(Aldrich, 33056-6) 的溶液, 在 25℃ 条件下解育 1 小时。

另取 20ml 在碳酸钠缓冲液 (100mM, pH 9) 中含有 119.8mg 头孢菌素 C 和 54mg 磺基琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺基甲基) 环己烷-1-羧酸酯的溶液, 在 25℃ 条件下解育 1 小时。

将上述两种溶液混合, 加入 3ml 的 500mM NaH_2PO_4 调终溶液的 pH 值为 7.1, 将此溶液在 25℃ 条件下解育 2 小时。解育后的混合溶液用 1 升磷酸钠缓冲液 (10mM, pH 9) 透析三次, 然后用 0.22 μm 过滤器过滤终溶液, 将此溶液等分成几份, 置于 -20℃ 备用。

在使用时, 解冻上述的等分溶液, 在它们被沉积于膜上之前, 向其中加入食品染料, 从而在任何时候均可指示沉积物的精确位置和定性的痕迹。

鉴别剂和游离的相对于样品中的抗生素过量的标志物偶联, 第一捕获物质可以固定该偶联的鉴别剂。

2.4.2 第二捕获物质

第二捕获物质是由兔免疫球蛋白溶液构成的, 其中免疫球蛋白在 10mM 磷酸钠 pH7.5、5mg/ml 人 γ 球蛋白缓冲液中的浓度为 0.5mg/ml。当液体在试验装置中迁移时, 该第二捕获物质可滞留参照物。

2.5 试验装置

包括膜 (2)、(3) 和 (4) 的试验装置按照实施例 1.1 中介绍的方法进行组装, 这些试验装置的膜 (3) 在近端携带实施例 2.4.1 中介绍的捕获物质, 在远端携带实施例 2.4.2 中介绍的捕获物质。将捕获物质按照实施例 1.2 中介绍的方法沉积。

2.5.1 测试 1- 快速测试

准备 7 份分别含有 0、2、4、5、6、8 和 10ppb 青霉素 G 的牛奶样品, 这些溶液均按下述方法进行检测。

取 200 μl 牛奶样品和 32.8 μl 实施例 2.2.3 中制备的溶液 A, 置于 Effendorf 管中, 将此混合溶液在 47℃ 解育 3 分钟。然后将一个试验装

置垂直置于Effendorf管中，使试验装置的第一末端与混合溶液接触，当其在47℃孵育2分钟时，混合液迁移过试验装置。

下面的表1表明了7个测试样品的结果。用0到10之间的数代表被检测的带的强度值，值为10代表强度最大的带，值为0代表强度最小的带。在这个标准中，参照物的强度值为6。在第一个检测带中观察到的信号强度与同样品中含的青霉素G的量成反比。

表 1

青霉素G (ppb)	强 度	
	第一条带	第二条带
0	10	6
2	8	6
4	5	6
5	3	6
6	2	6
8	1	6
10	0	6

在这个例子中，当第一条带的强度低于参照物带的强度时，可认为这个测试的结果是阳性的。表1中的结果表明，这个测试可在5分钟之内检测牛奶样品中的浓度低至4ppb的青霉素G。

2.5.2 测试2－敏感性测试

准备6份分别含有0、2、2.5、3、4和5ppb青霉素G的牛奶样品，这些溶液均按下述方法进行检测。

取200 μl牛奶样品和32.8 μl实施例2.2.3中制备的溶液A，置于Effendorf管中，将此混合溶液在47℃孵育5分钟。然后将一个试验装置垂直置于Effendorf管中，使试验装置的第一末端与混合溶液接触。当其在47℃孵育2分钟时，混合液迁移过试验装置。

下面的表2表明了7个测试样品的结果，用0到10之间的数代表被检测的带的强度值，值为10代表强度最大的带，值为0代表强度最小的

带。在这个标准中，参照物的强度值为6。在第一个检测带中观察到的信号强度与样品中含有的青霉素G的量成反比。

表 2

青霉素G (ppb)	强 度	
	第一条带	第二条带
0	10	6
2	7	6
2.5	5	6
3	4	6
4	1	6
5	0	6

在这个例子中，当第一条带的强度低于参照物带的强度时，可认为这个测试的结果是阳性的。表2中的结果表明，这个测试可在7分钟之内检测牛奶样品中的浓度低至2.5ppb的青霉素G。

实施例3. 用BlaR检测牛奶中的 β 内酰胺环抗生素

这个实施例举例说明了被卫生部门监测的 β 内酰胺环抗生素的检测。在这个实施例中描述的测试是用与金珠偶联的受体BlaR-CTD作为标记试剂，并且应用了在其上固定有膜的支持物组成的试验装置。

3.1 BlaR-CTD（鉴别剂）与金珠（标志剂）的偶联

3.1.1 BlaR-CTD的生物素化

取3.79ml浓度为6.6mg/ml的识别试剂BlaR-CTD的溶液，加入到磷酸钠缓冲液（20mM,pH 7）中，然后向此溶液中加入41.71ml碳酸氢盐缓冲液(0.1M碳酸氢钠,pH 9)，及2ml N-羟基琥珀酰亚胺6-（生物素酰胺）己酸酯（在同样的碳酸氢盐缓冲液中，其浓度为2.23mg/ml）。在室温和避光的条件下，用LABINCO旋转轴试管搅动机（由比利时VEL提供）以2转/分钟轻轻搅动此溶液2小时。2.5 ml Tris缓冲液（1 M ,pH8）和反应混合液在相同的条件下解育30分钟，

将这样得到的溶液用HNM缓冲液（Hepes 100mM,pH 8,NaCl 500mM,MgCl₂250mM）透析24小时。通过此方法既得到了生物素化的BlaR-CTD溶液，用HNM-SBA缓冲液（Hepes 500 mM,pH 8,NaCl 500mM,MgCl₂250mM, BAS 10mg/ml）将其稀释，终浓度为250 μg BlaR-CTD/ml缓冲液，置于-20℃备用。

3.1.2 标记试剂

使用的标记试剂是直径为40nm的金颗粒，在其上沉积有羊抗生物素抗体，悬浮在pH为7.2的2mM四硼酸钠水溶液中，用0.1%的叠氮化钠（可从British Biocell(Ref.GAB40)得到）稳定。这些悬浮液在520nm处的光密度大约为10，蛋白的浓度大约为24 μg/ml。

3.1.3 生物素化的BlaR-CTD与金珠的偶联

在实施例3.1.1中准备的生物素化的BlaR-CTD溶液用HNM-SBA缓冲液（Hepes 500 mM,pH 8,NaCl 500mM,MgCl₂250mM, BAS 10mg/ml）稀释114.7倍。在室温下，将22.5份体积稀释的生物素化BlaR-CTD溶液、7.5份体积的HNM-SBA缓冲液、9.27份体积的用于标记生物素化的BlaR-CTD的金颗粒悬浮液和6份体积的参照物金颗粒悬浮液混合（见下面的实施例3.1.4）。

3.1.4 独立的参照物

此测试中还使用这样一种参照物，它可以提供一条带，此带的强度可迅速定量样品中存在的抗生素。

为此目的，使用直径为40nm的金颗粒，在其上沉积有羊抗兔免疫球蛋白抗体。这些颗粒可从British Biocell(Ref.GAB40)得到，为在pH7.2 2mM四硼酸钠水溶液中的悬浮液形式，被0.1%的叠氮化钠稳定。这些悬浮液在520nm处的光密度大约为3，蛋白的浓度大约为6 μg/ml。

3.2 捕获物质

3.2.1 第一捕获物质－参照物抗生素

取8ml在碳酸钠缓冲液（100mM,pH 9）中含有213mg人γ球蛋白（G4386, Sigma）和8.6mg盐酸2-亚氨基硫杂环戊烷(Aldrich,33056-6)

的溶液，在25℃条件下解育1小时。

另取20ml在碳酸钠缓冲液（100mM,pH 9）中含有119.8mg头孢菌素C和54mg磺基琥珀酰亚胺基 4-（N-马来酰亚胺基甲基）环己烷-1-羧酸酯的溶液，在25℃条件下解育1小时。

将上述两种溶液混合，加入3ml 的500mM NaH₂PO₄调终溶液的pH值为7.1，将此溶液在25℃条件下解育2小时。解育后的混合溶液用1升磷酸钠缓冲液（10mM,pH 9）透析三次，后用0.22 μm过滤器过滤终溶液，将此溶液等分成几份，置于-20℃备用。

在使用时，解冻上述的等分溶液，在它们被沉积于膜上之前，向其中加入食品染料，使得在任何时候均可指示沉积物的精确位置和定性痕迹。

BlaR-CDT和样品中的与抗生素相比过量的金珠偶联，第一捕获物质可以固定这些偶联的BlaR-CDT。

3.2.2 第二捕获物质 – 可以固定独立参照物

第二捕获物质是由兔免疫球蛋白溶液（Sigma I 5006）构成的，其中免疫球蛋白在10mM磷酸钠 pH7.5、5mg/ml人γ球蛋白缓冲液中的浓度为0.5mg/ml。当液体在试验装置中迁移时，该第二捕获物质可滞留独立参照物。

3.3 试验装置

包括膜（2）、（3）和（4）的试验装置按照实施例1.1中介绍的方法进行组装，这些试验装置的膜（3）在近端携带实施例3.2.1中介绍的捕获物质，在远端携带实施例3.2.2中介绍的捕获物质。将捕获物质按照实施例1.2中介绍的方法沉积。

3.4 检测牛奶中的抗生素

3.4.1 3分钟测试- 快速测试

准备7份分别含有0、1、2、3、4、5和6ppb 青霉素G的牛奶样品，这些溶液均按下述方法进行检测。

取200 μl牛奶样品和45.27 μl实施例3.1.3中制备的溶液，置于一玻璃烧瓶中，将此混合溶液在47℃解育1分钟。然后将一个试验装置垂

直置于玻璃烧瓶中，使试验装置的第一末端与混合溶液接触，并且使第二末端靠在玻璃烧瓶的壁上。当它在47℃孵育2分钟时，混合液迁移经过试验装置。

下面的表1表明了7个测试样品的结果，用0到10之间的数代表被检测的带的强度值，值为10代表强度最大的带，值为0代表强度最小的带。在这个标准中，参照物的强度值为6。在第一个检测带中观察到的信号强度与同样品中含的青霉素G的量成反比。

表 1

青霉素G (ppb)	强 度	
	第一条带	第二条带
0	10	6
1	9	6
2	9	6
3	4	6
4	0	6
5	0	6
6	0	6

在这个例子中，当第一条带的强度低于参照物带的强度时，可认为这个测试的结果是阳性的。表1中的结果表明，这个测试可在不到3分钟的时间里检测牛奶样品中的浓度低于4ppb的青霉素G。

在相同的条件下，本检测试验也可对其它的β内酰胺环抗生素进行检测。这个在3分钟内进行的检测试验可以检测的牛奶中抗生素的浓度是：低至5ppb的羧氨苄青霉素；低至5 ppb的氨苄青霉素；小于10 ppb的邻氯青霉素；小于20 ppb的双氯青霉素；小于20 ppb的苯唑西林；低至20 ppb的头孢吡林。

1.3.2 五分钟测试

准备6份分别含有0、2、4、6、8和10ppb 邻氯青霉素的新鲜牛奶样品，这些溶液均按下述方法进行检测。

取200 μ l牛奶样品和45.27 μ l实施例3.1.3中制备的溶液，放入一玻璃烧瓶中，将此混合溶液在47℃孵育3分钟。然后将一个试验装置垂直置于玻璃烧瓶中，使试验装置的第一末端与混合溶液接触，并且使第二末端靠在玻璃烧瓶的壁上。当其在47℃孵育2分钟时，混合液迁移经过试验装置。

下面的表2表明了6个测试样品的结果，用0到10之间的数代表被检测的带的强度值，值为10代表强度最大的带，值为0代表强度最小的带。在这个标准中，参照物的强度值为6。在第一个检测带中观察到的信号强度与样品中含有的邻氯青霉素的量成反比。

表 2

邻氯青霉素 (ppb)	强 度	
	第一条带	第二条带
0	10	6
2	6	6
4	5	6
6	3	6
8	3	6
10	3	6

在这个例子中，当第一条带的强度低于参照物带的强度时，可认为这个测试的结果是阳性的。表2中的结果表明，这个测试可在5分钟之内检测牛奶样品中的浓度低至4ppb的邻氯青霉素。

在相同的条件下，本检测试验也可对其它的 β 内酰胺环抗生素进行检测，这个在5分钟内进行的检测可以检测的牛奶中抗生素的浓度是：低至3ppb的青霉素G；低至4ppb的羧氨苄青霉素；低至4ppb的氨苄青霉素；低至8ppb的双氯青霉素；低至8ppb的苯唑西林；低至16ppb的头孢吡林；低至100ppb的头孢噻夫；小于20ppb的头孢苯酰；小于20ppb的萘夫西林；低至60ppb的头孢唑啉。

在运奶车将牛奶运到地窖之前，这个测试尤其适合作为一个分类

测试。

1.3.3 9分钟测试

准备6份分别含有0、4、6、8、10和12ppb 头孢吡林的新鲜牛奶样品，这些溶液均按下述方法进行检测。

取200 μ l牛奶样品和45.27 μ l实施例3.1.3中制备的溶液，放入一玻璃烧瓶中，将此混合溶液在47℃孵育7分钟。然后将一个试验装置垂直置于玻璃烧瓶中，使试验装置的第一末端与混合溶液接触，并且使第二末端靠在玻璃烧瓶的壁上。当其在47℃孵育2分钟时，混合液迁移过试验装置。

下面的表3表明了6个测试样品的结果，用0到10之间的数代表被检测的带的强度值，值为10代表强度最大的带，值为0代表强度最小的带。在这个标准中，参照物的强度值为6。在第一个检测带中观察到的信号强度与样品中含有的头孢吡林的量成反比。

表 3

头孢吡林 (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

在这个例子中，当第一条带的强度低于参照物带的强度时，可认为这个测试的结果是阳性的。表3中的结果表明，这个测试可在9分钟之内检测牛奶样品中的浓度低至6ppb的头孢吡林。

在相同的条件下，本检测也可对其它的 β 内酰胺环抗生素进行检测，这个在9分钟内进行的检测可以检测的牛奶中抗生素的浓度是：低至3ppb的青霉素；低至4ppb的羟氨苄青霉素；低至4ppb的氨苄青

霉素；低至4ppb的邻氯青霉素；低至8ppb的双氯青霉素；低至8ppb的苯唑西林；低至80ppb的头孢噻夫；小于20ppb的头孢苯醌；小于20ppb的萘夫西林；低至45ppb的头孢唑啉。

因而这个在9分钟内完成的检测，可以检测所有的目前被欧洲各政府监测的抗生素，且可检测低至这些政府的法定限值的浓度。

1.3.4 20分钟测试

准备6份分别含有0、20、30、40、50和60ppb 头孢噻夫的新鲜牛奶样品，这些溶液均按下述方法进行检测。

取200 μ l牛奶样品和45.27 μ l实施例3.1.3中制备的溶液，放入一玻璃烧瓶中，将此混合溶液在47℃孵育18分钟。然后将一个试验装置垂直置于玻璃烧瓶中，使试验装置的第一末端与混合溶液接触，并且使第二末端靠在玻璃烧瓶的壁上。当其在47℃孵育2分钟时，混合液迁移过试验装置。

下面的表4表明了6个测试样品的结果，用0到10之间的数代表被检测的带的强度值，值为10代表强度最大的带，值为0代表强度最小的带。在这个标准中，参照物的强度值为6。在第一个检测带中观察到的信号强度与样品中含有的头孢噻夫的量成反比。

表4

(ppb)	头孢噻夫	强度
	第一条带	第二条带
0	10	6
20	6	6
30	5	6
40	4	6
50	3	6
60	3	6

在这个例子中，当第一条带的强度低于参照物带的强度时，可认为这个测试的结果是阳性的。表4中的结果表明，这个测试可在20分

钟之内检测牛奶样品中的浓度低至30ppb的头孢塞夫。

因而这个在20分钟内完成的检测，在一个单个的测试中，可以检测所有的目前被欧洲各政府监测的抗生素，且可检测低至这些政府的法定限值的浓度。

实施例4. 试验装置在塑料盒中的应用

应用在实施例1.6中介绍的试验装置，在这个例子中，样品与试验装置的接触是通过将孵育后的混合液沉积于为这个目的而设计的盆状开口中实现的。

