

原料乳中 β -内酰胺酶检测试剂盒的研究

谢岩黎^{1*}, 张鑫潇², 史秀丽³, 孙淑敏¹

(1. 河南工业大学 粮油食品学院, 郑州 450001; 2. 南阳市工商行政管理局, 南阳 473003;
3. 郑州市电子信息工程学校, 郑州 450007)

摘要: **目的** 制备原料乳中 β -内酰胺酶的快速检测试剂盒, **方法** β -内酰胺酶分解青霉素钾的产物青霉噻唑酸具有还原性, 能将二价铜还原为一价铜, 2, 2'-联喹啉与一价铜反应生成的是紫红色配合物, 颜色深浅与 β -内酰胺酶的量在一定范围内呈线性关系。 **结果** 利用可见分光光度法优化出试剂盒最佳检测条件为: 0.05% 2, 2'-联喹啉添加量为 2.4 mL, 20 mmol/L 的 CuSO_4 最佳添加量 0.2 mL, 原料乳添加量为 0.1 mL; 配制 β -内酰胺酶的标准品浓度梯度溶液 0~200 U/mL 进行显色反应后, 利用分光测色仪测定颜色反应 L^* 、 a^* 和 b^* 值数据, 并应用色彩模块软件对其进行模拟, 制作标准比色卡; 原料乳样品显色 15 min 后与标准比色卡对比, 确定牛奶中 β -内酰胺酶浓度, 试剂盒最低检出限为 4 U/mL。 **结论** β -内酰胺酶检测试剂盒法具有快速、操作简单、经济实用等特点, 易于普及和现场测定。

关键词: β -内酰胺酶; 试剂盒; 乳制品

Study on the test kit of β -lactamase in raw milk

XIE Yan-Li^{1*}, ZHANG Xin-Xiao², SHI Xiu-Li³, SUN Shu-Min¹

(1. School of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;
2. Administration for Industry and Commerce of Nanyang City, Nanyang 473003, China;
3. Zhengzhou Electronic and Information Engineer, Zhengzhou 450007, China)

ABSTRACT: Objective To make the kit for rapid detection of β -lactamase in raw milk. **Methods** Penicilloic acid, the decomposer of penicillin G potassium by β -lactamase, has the reducibility and can reduce Cu^{2+} into Cu^+ , the 2, 2'-biquinolyl can coupling with Cu^+ to display purple, which the color depth and the amount of β -lactamase are in linearity within a certain range. **Results** Using visible spectrophotometry to optimize the best detection condition of box for: 0.05% 2, 2'-Alliance quinoline added volume for 2.4 mL, 20 mmol/L of CuSO_4 for 0.2 mL, raw dairy samples added volume for 0.1 mL; β -Lactamase standard solution for gradient concentration 0~200 U/mL for colour reaction is prepared, using spectro colorimeter to determine the color reaction L^* , and a^* and b^* value data, and applicate the color module software on its for simulation to prepare the standard color card. After 15 min for Color rendering of sample, it is compared to the standard color cards to judge the concentrations of β -lactamase in a sample. The detection limit of Kit was 4 U/mL. **Conclusion** β -lactamase kit method is of rapid, simple, economical and practical, easy to popularize and field tests.

KEY WORDS: β -lactamase; test kit; dairy products

*通讯作者: 谢岩黎, 博士, 教授, 主要研究方向为食品营养与安全。E-mail: ylxie2013@163.com

*Corresponding author: XIE Yan-Li, Ph.D, Professor. School of Food Science and Technology, Henan University of Technology, 1# Lianhua Rd, High-Tech Industrial Development Zone, Zhengzhou 450001, China. E-mail: ylxie2013@163.com

1 引言

β -内酰胺酶(β -lactamase)是由革兰氏阳性细菌产生和分泌的,可选择性分解牛奶中残留的 β -内酰胺类抗生素,使微生物法、酶联免疫法等常规的检测方法失效,从而无法正确判断是否为“无抗奶”,掩盖抗生素超标的事实^[1,2]。青霉素钾在 β -内酰胺酶作用下,酶中亲核性基团向 β -内酰胺环进攻,开环后可脱羧重排生成中间体青霉噻唑酸,其具有还原性和酸性,运用碘量法、酸度法、高效液相色谱法、分光光度法等方法测定样品中青霉噻唑酸的含量,间接检测牛奶中的 β -内酰胺酶^[3]。碘量法中碘易吸附在指示淀粉颗粒表面,影响终点的正确判断^[4];酸度法是根据在 β -内酰胺酶的作用下,青霉素被酶解生成青霉噻唑酸,该酸是一种强酸,可电离产生 H^+ ,使牛奶的pH值下降,酸度法需要一定的底物浓度,检测灵敏度较低^[5-11];高效液相色谱法灵敏,但难以实现快速检测的需要^[6]。因青霉噻唑酸具有还原性,能将二价铜还原为一价铜,而亚铜试剂与一价铜具有很好的选择性^[7,8]。在亚铜试剂中,2,9-二甲基-1,10-菲啰啉的反应环境要求pH 3.2~6.5,与一价铜反应生成的是黄色配合物,最佳吸收峰在460 nm左右;2,2'-联喹啉的反应环境要求pH 3.5~7.0,与一价铜反应生成紫红色配合物,最佳吸收峰在520 nm左右^[9-11]。牛奶的pH值在6.8左右,且紫红色的颜色反应肉眼容易观察,故选择2,2'-联喹啉做显色剂,在可见分光光度法的前期研究的基础上,设计能快速、简便检测牛奶中 β -内酰胺酶的试剂盒。

2 材料与方法

2.1 试验材料

β -内酰胺酶标准品,中国药品生物制品检定所;青霉素钾标准品,中国药品生物制品检定所;2,2'-联喹啉(用无水乙醇配制),上海晶纯试剂有限公司;抗坏血酸,天津市科密欧化学试剂有限公司;吐温80、冰醋酸、三水合乙酸、三氯乙酸、 $CuSO_4$ 均为分析纯,购自洛阳市化学试剂厂。

2.2 试验仪器

TU 1901 双光束紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;SMY-2000 全自动测色色

差仪,北京盛名扬科技开发有限责任公司;AL 204 型电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;雷磁PHS-3 C型pH计,上海精密科学仪器有限公司;Proline 移液枪,上海科华实验系统有限公司;DK-S 24 型电热恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;TDL-4 型台式离心机,上海安亭科学仪器厂制造。

2.3 实验方法

2.3.1 显色剂用量优化

配制青霉素标准品浓度为50000 U/mL、 β -内酰胺酶50 U/mL的样品,37℃水浴1 h,按1:1比例添加13%的TCA溶液,倒入离心管中,4000 rpm离心15 min,取上清液0.1 mL,分别加入显色剂0.05% 2,2'-联喹啉1.8、2.1、2.4、2.7、3.0、3.3 mL,混合均匀,分别加入20 mmol/L的 $CuSO_4$ 0.15 mL,混合均匀,倒入比色皿中,15 min后开始光谱扫描。

2.3.2 $CuSO_4$ 用量优化

配制青霉素标准品浓度为50000 U/mL,含 β -内酰胺酶50 U/mL的样品,37℃水浴1 h,按1:1体积比添加13%的TCA溶液,倒入离心管中,4000 rpm离心15 min,取上清液0.1 mL,分别加入0.05% 2,2'-联喹啉2.4 mL,混合均匀,分别加入20 mmol/L的 $CuSO_4$ 0.05 mL、0.1、0.15、0.2、0.25 mL,混合均匀,倒入比色皿中,15 min后开始光谱扫描。

2.3.3 原料乳样品添加量优化

配制青霉素标准品浓度为50000 U/mL,空白和含 β -内酰胺酶50 U/mL的样品,37℃水浴1 h,按1:1体积比添加13%的TCA溶液,置入离心管中,4000 r/min离心15 min,分别取上清液0.05、0.1、1.5、2.0、2.5 mL,混合均匀,分别加入20 mmol/L的 $CuSO_4$ 0.2 mL,显色剂0.05% 2,2'-联喹啉添加量为2.4 mL,混合均匀好后倒入比色皿中,15 min后开始光谱扫描。

2.3.4 标准比色卡的制备

配制分别含有浓度梯度0、4、12、25、50、100、150、200 U/mL β -内酰胺酶的标准品溶液,分别加入青霉素钾底物浓度为50000 U/mL的溶液中;混合均匀后37℃温浴60 min后,加入5 mL 10%~15%TCA,4000 r/min离心10 min,取上清液100 μ L,置入试管,加入0.1% 2,2'-联喹啉乙醇溶液2.5 mL和40 mmol/L $CuSO_4$ 0.1 mL混合均匀,室温15 min的显色反应;利用分光测色仪测定反应溶液的 L^* 、 a^* 和 b^* 值数据,输入计算机,利用颜色模块软件对色彩 L^* 、 a^* 和 b^*

数据进行模拟, 制作标准比色卡。按 β -内酰胺酶的标准品溶液的浓度的高低, 将标准比色块进行排列、粘贴, 制成 β -内酰胺酶的标准比色卡^[12]。

2.3.5 试剂盒试剂的配置

试剂盒组成为 A: 10% TCA 的配置: 10 g 三氯乙酸溶于蒸馏水定容至 100 mL; B: 0.05% 2, 2'-联喹啉乙醇溶液, 0.05 g 2, 2'-联喹啉溶于乙醇定容 100 mL; C: 20 mmol/L CuSO_4 : 0.5 g 无水 CuSO_4 溶于蒸馏水定容至 100 mL。

2.3.6 理论最低检出限

2.3.6.1 标准曲线的绘制

配制青霉素标准品浓度为 50000 U/mL 的溶液, 分别配制含有 0、4、12、25、50、100、150、200、250、500 U/mL β -内酰胺酶的样品, 37 °C 水浴 1 h, 按 1:1 比例添加 13% 的 TCA 溶液, 置入离心管中, 4000 r/min 离心 15 min。按最佳优化条件处理样品, 混合均匀后, 倒入比色皿中, 15 min 后开始光谱扫描, 按照光谱扫描图中 547 nm 处的峰值绘制标准曲线, 并确定检出限。

2.3.6.2 理论最低检出限

利用可见分光光度计扫描样品的颜色反应, 根据扫描光谱图中 547 nm 处的峰高, 做 β -内酰

胺酶浓度与 547 nm 处峰高的线性关系图。并根据空白重复试验的标准方差数据计算检出限, 并判断可操作性^[13]。并与碘量法、酸度法、高效液相色谱法、可见分光光度法和试剂盒在检测限、相关性、可操作性、检测时间、操作简易程度上进行比较^[1,5,7,10,14,15]。

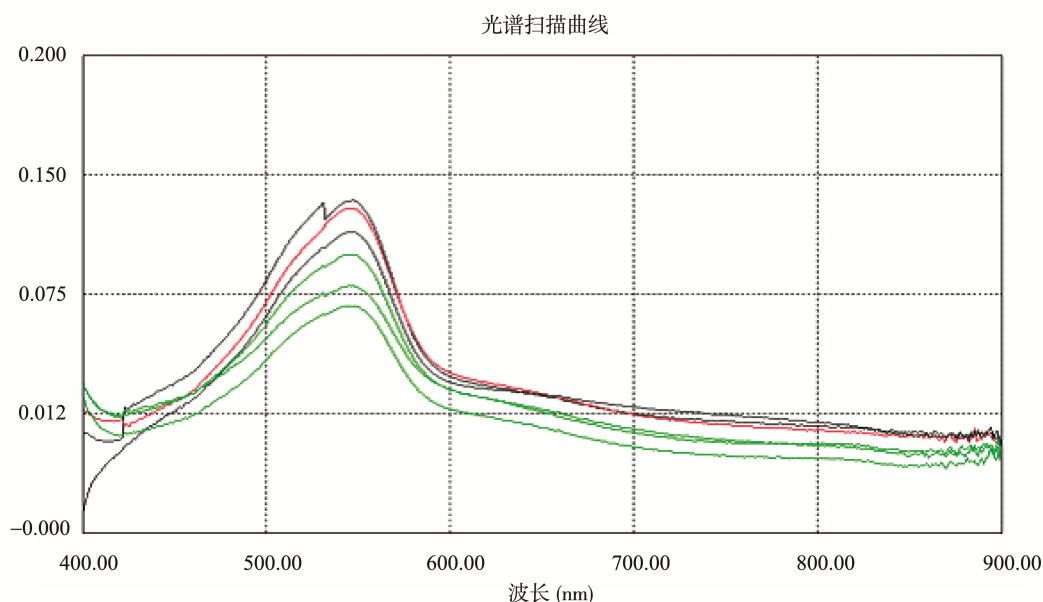
3 结果与讨论

3.1 检测条件优化

3.1.1 最佳显色剂添加量优化

样品添加量为 0.1 mL, 20 mmol/L 的 CuSO_4 试剂添加量为 0.15 mL, 底物浓度为 50000 U/mL, 反应时间为 15 min, 显色剂 0.05% 2,2'-联喹啉添加量分别为 1.8、2.1、2.4、2.7、3.0、3.3 mL, 其光谱扫描图如图 1 所示。

由图 1 可知, 2 号样的峰值最大, 随着显色剂添加量的增加, 2 号样的峰值比 1 号样大, 3 号样比 2 号样峰值稍低, 继续增大显色剂添加量, 峰值逐级降低。2 号样虽然比 3 号样峰值稍高, 但是峰型波动较大, 重复扫描 3 次, 波动依然较大, 故选择 3 号样品条件为最佳条件, 即显色剂 0.05% 2,2'-联喹啉最佳添加量为 2.4 mL。



(在 547 nm 处, 按照峰高从上往下依次为②2.1 mL③2.4 mL①1.8 mL④2.7 mL⑤3.0 mL⑥3.3 mL)

图 1 显色剂 0.05% 2, 2'-联喹啉的浓度对样品扫描光谱图的影响

Fig. 1 Effect of chromogenic reagent 2,2'-biquinolyl concentrations on scanning spectrogram

3.1.2 最佳 CuSO₄ 添加量优化

样品添加量为 0.1 mL, 底物浓度为 50000 U/mL, 反应时间为 15 min, 显色剂添加量为 2.4 mL, 20 mmol/L 的 CuSO₄ 试剂添加量分别 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 mL, 其光谱扫描图如图 2 所示。

由图 2 可知, 当 20 mmol/L 的 CuSO₄ 添加量为 4 号样品添加量时在 547 nm 处的峰值最大, 故 20 mmol/L 的 CuSO₄ 最佳添加量为 0.2 mL。

3.1.3 原料乳最佳添加量

底物浓度为 50000 U/mL, 显色剂 0.05%2, 2'-联喹啉添加量为 2.4 mL, 20 mmol/mL 的 CuSO₄ 试剂添加量为 0.2 mL, 显色时间为 15 min, 样液添加量分别为 0.05、0.1、1.5、2.0、2.5 mL, 其光谱扫描图如图 3 所示。

由图 3 可知, 2 号样品在 547 nm 处的峰值最高, 故样液的最佳添加量为 2 号样品添加量, 即 0.1 mL 添加量。由上可知, 最佳条件为底物浓度 50000 U/mL, 显色剂添加量为 2.4 mL, 20 mmol/L 的 CuSO₄ 添加量为 0.2 mL, 样液添加量为 0.1 mL, 显色时间为 15 min。

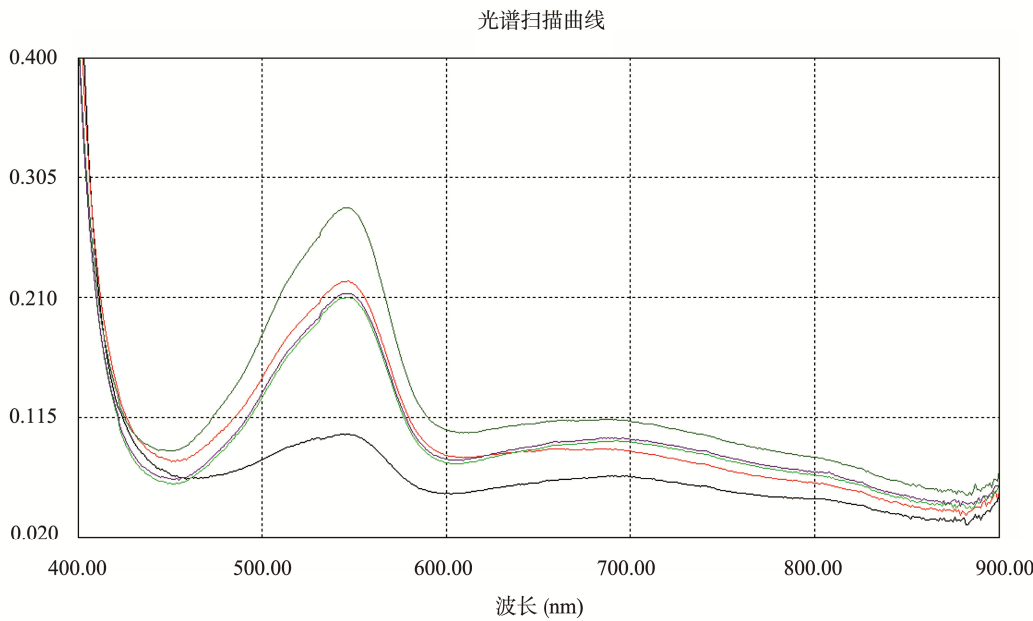
3.2 标准比色卡的制备

取 2.3.4 中 8 个处理后样品显色图的颜色, 利用分光测色仪测定试纸 L*、a*和 b*值数据, 输入计算机, 利用颜色模块软件对色彩 L*、a*和 b*数据进行模拟, 制作标准比色块。制作 β -内酰胺酶的标准比色卡, 如图 4 所示。其中 a 代表的 β -内酰胺酶浓度为 0 U/mL, b 为 4 U/mL, c 为 12 U/mL, d 为 25 U/mL, e 为 50 U/mL, f 为 100 U/mL, g 为 150 U/mL, h 为 200 U/mL。可以看出颜色梯度变化明显, 随着 β -内酰胺酶浓度增加红色逐级变深。测得比色卡的值为下表 2 所示。

3.3 理论最低检出限及实际检出限

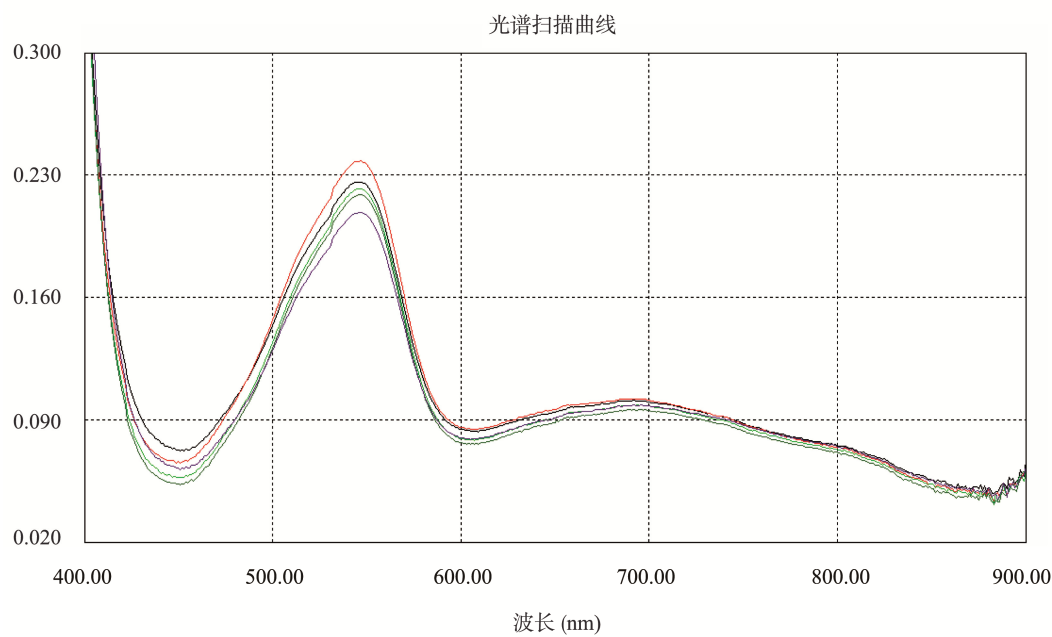
3.3.1 标准曲线

在最佳条件下, 即底物浓度 5000 U/mL, 显色剂添加量为 2.4 mL, 20 mmol/L 的 CuSO₄ 添加量为 200 mL, 样液添加量为 0.1 mL, 显色时间为 15 min。可见分光光度计扫描 β -内酰胺酶的浓度分别为 0、4、12、25、50、100、150、200、250、500 U/mL 的样品, 其扫描光谱图如图 5 所示。



(在 547 nm 处, 从上到下依次为④②⑤③①号样品)

图 2 CuSO₄ 添加量对样品扫描光谱图的影响
Fig. 2 Effect of CuSO₄ added on scanning spectrogram



(在 547 nm 处, 从上到下依次为②①③④⑤)

图 3 原料乳样品添加量对扫描光谱图的影响

Fig. 3 Effect of raw milk sample content on scanning spectrogram

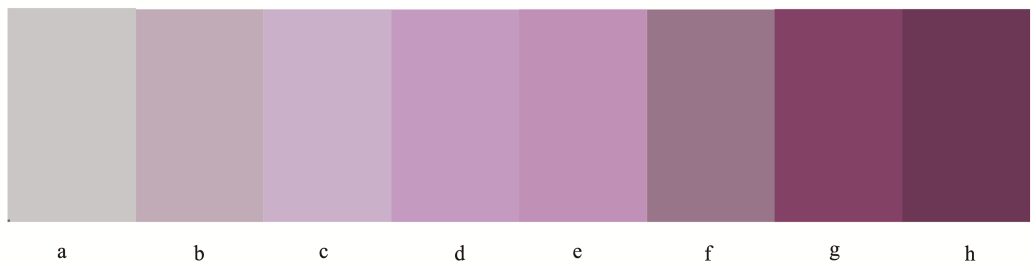


图 4 β -内酰胺酶标准比色卡

Fig. 4 Standard color card of β -lactamase

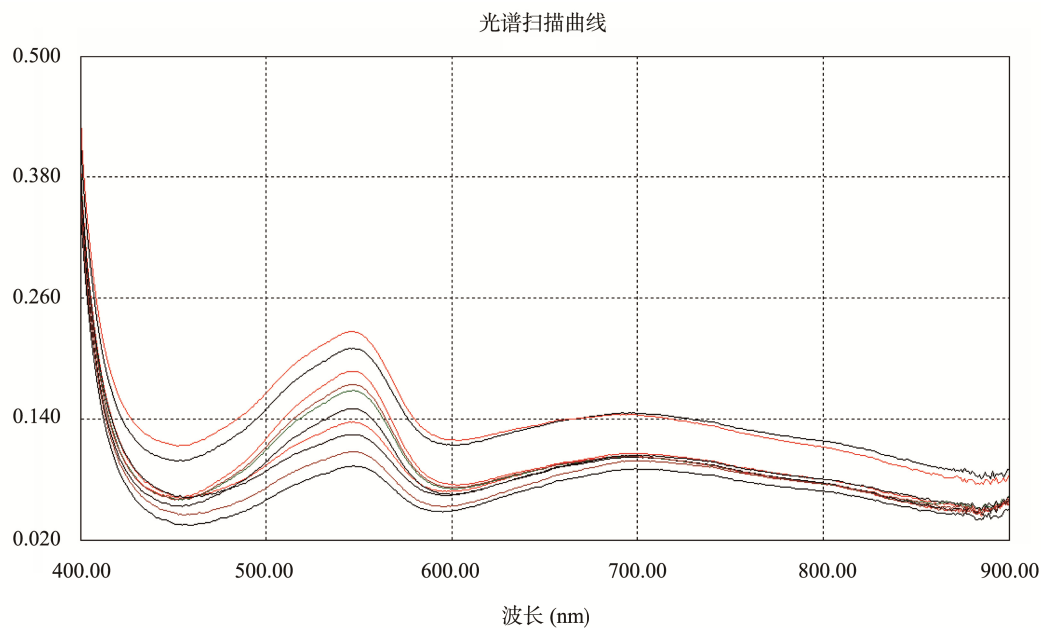
表 1 色卡的 L、a、b 值
Table 1 Color cards of L, a, b values

色卡	a	b	c	d	e	f	g	h
L 值	84	76	79	73	70	53	36	29
a 值	-1	7	11	21	24	18	37	32
b 值	-3	-7	-12	-17	-17	-11	-17	-19

备注: 其中 L 为亮度, a 为红度, b 为蓝度, 可根据此数据制作标准比色卡。

由图 5 可知, 随着 β -内酰胺酶浓度的增大, 可见分光光度法在 547 nm 处检测到的峰值高逐渐升高, 标准曲线回归方程为 $Y=0.0144X+0.0791$, R^2 为 0.9936, β -内酰胺酶浓度与峰值的相关性很好。

3.3.2 理论最低检出限
在最优条件下, 三次空白重复试验所得的光谱扫描图如 6, 计算得出 $S_b=0.0165$ 。
理论最低检出限为: $CL=3S_b/b=3\times0.0165/0.0144=$



(按 547 nm 处峰从低到高分别为含 0、4、12、25、50、100、150、200、250、500 U/mL β -内酰胺酶的样品)

图 5 梯度检测光谱扫描图

Fig. 5 Spectra scanning of gradient detection

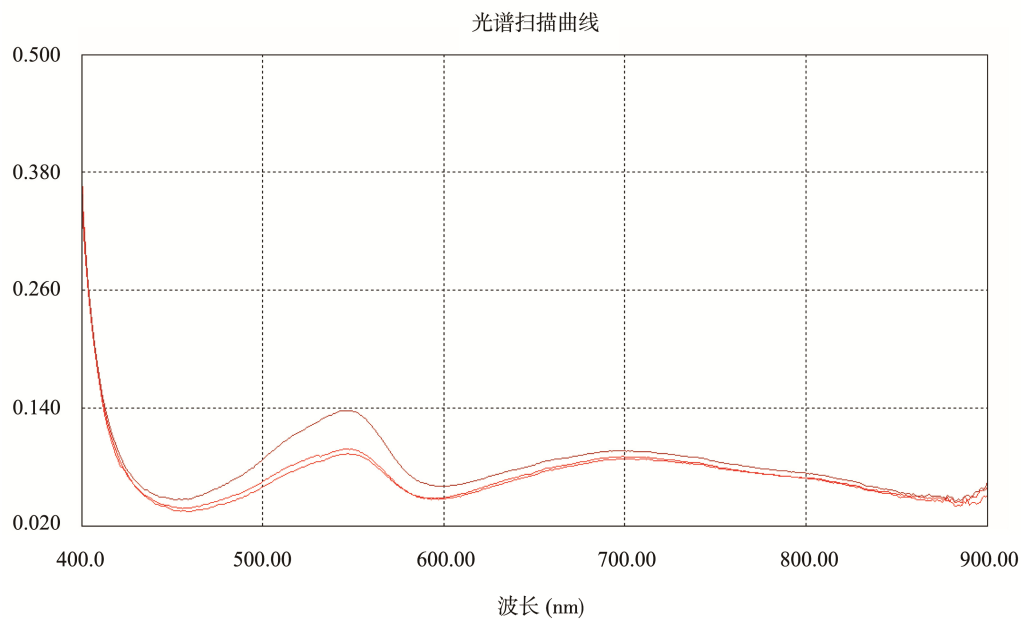


图 6 空白重复试验光谱扫描图

Fig. 6 Spectra scanning of blank repeat test

3.44 U/mL, 因此, 理论检出限 3.44 U/mL。具有还原性的维生素 C 对青霉噻唑酸能将二价铜还原为一价铜后, 与 2,2'-联喹啉与一价铜反应有干扰, 但是在研究中高效液相色谱法检测牛奶中的 VitC 含量未能

检出。
由前期的研究结果和参考文献可知^[1,5,7,10,14,15], 碘量法、酸度法、高效液相色谱法、可见分光光度法实际检测限分别为 15 U/mL、12.02 U/mL、4 U/mL

和 4 U/mL, 试剂盒检测 β -内酰胺酶与之相比, 检出限低、所用检测时间最短、且易于操作等优势。

4 结 论

利用可见分光光度法优化出试剂盒最佳检测条件为: 0.05% 2,2'-联喹啉添加量为 2.4 mL, 20 mmol/L 的 CuSO_4 最佳添加量 0.2 mL, 乳品样品添加量为 0.1 mL; 配制 β -内酰胺酶的标准品浓度梯度溶液 0 ~ 200 U/mL 进行显色反应后, 利用分光测色仪测定颜色反应 L^* 、 a^* 和 b^* 值数据, 并应用色彩模块软件对其进行模拟, 制作标准比色卡; 试剂盒最低检出限为 4 U/mL。与碘量法、酸度法、高效液相色谱法及可见分光光度法对比, 试剂盒法具有快速、操作简单、经济实用, 易于普及和现场测定。

参考文献

- [1] Li LX, Guo CH, Ai LF, *et al.* Research on degradation of penicillins in milk by β -lactamase using ultra-performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Dairy Sci*, 2014, 97(7): 3983–4660
- [2] Korycka-Dahl M, Richardson T, Bradley Jr RL. Use of microbial beta-lactamase to destroy penicillin added to milk [J]. *J Dairy Sci*, 1985, 68(8): 1910–1916.
- [3] Smahakfoury JN, Araj GF. Recent developments in beta lactamases and extended spectrum beta-lactamases [J]. *Biometrical J*, 2003, 327: 1201–1213.
- [4] Immel S, Lichtenthaler FW. The hydrophobic topographies of amylose and its blue iodine complex [J]. *Starch-starke*, 2000, 52: 1–8.
- [5] 刘珊珊, 周正, 周巍, 等. 酸度计法快速检测牛奶中残留的 β -内酰胺酶[J]. *食品科学*, 2010, 31(10): 216–218.
Liu SS, Zhou Z, Zhou W, *et al.* Use of an acid meter for rapid determination of β -lactamase residue in milk [J]. *Food Sci*, 2010, 31(10): 216–218.
- [6] Urbain JL, Wittich CU, Campion SR. In vitro measurement of β -lactamase-catalyzed ampicillin hydrolysis by recombinant escherichia coli extracts using quantitative high performance liquid chromatography [J]. *Anal Biochem*, 1998, 260: 160–165.
- [7] 赵静玫, 都绛瑛. 青霉素裂解液的高效液相色谱分析[J]. *色谱*, 2001, 19(1): 88–89.
Zhao JM, Dou JY. Determination of degraded products of penicillin by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 2001, 19(1): 88–89.
- [8] 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(12): 113–116.
Cui SH, Li JY, Ma Y, *et al.* Characterization and detection of “antibiotic destroyer” in raw milk [J]. *Chin J Food Hyg*, 2007, 19(12): 113–116.
- [9] 郑颖, 王震, 范泉水, 等. TEM-116 型超广谱 β -内酰胺酶对牛奶中抗生素的清除[J]. *中国抗生素杂志*, 2008, 33(2): 122–124.
Zheng Y, Wang Z, Fan QS, *et al.* Study on the elimination of antibiotic in milk by TEM-116 type extended-spectrum β -Lactamase [J]. *Chin J Antibiot*, 2008, 33(2): 122–124.
- [10] Bake WL. β -lactamase assay using 2, 2'-bicinchoninate at neutral pH and room temperature [J]. *J Antibiot*, 1989, 11(5): 834–835.
- [11] Fernandez-Gonzalez A, Badia R, Diaz-Garcia ME. Insights into the reaction of β -lactam antibiotics with copper(II) ions in aqueous and micellar media: Kinetic and spectrometric studies [J]. *Anal Biochem*, 2005, 341: 113–121.
- [12] 赵良贵. 茶多酚检测试纸及其标准比色卡和它们的用途[P]. 中国 CN200810055044.9. 2008-6-4.
Zhao GG. Polyphenols test strip, standard colorimetric cards and their use [P]. China: CN200810055044.9. 2008-6-4.
- [13] 倪敏, 喻雨琴. 如何实施对检测实验室检验能力的确认[J]. *上海标准化*, 2010, (5): 25–31.
Ni M, Yu YQ. How to implement laboratory tests to confirm the ability to detect [J]. *Shanghai Standardization*, 2010, (5): 25–31.
- [14] 谢岩黎, 张鑫潇, 严瑞东, 等. 碘量法对乳制品中 β -内酰胺酶的检测[J]. *中国乳品工业*, 2010, 38(12): 36–37.
Xie YL, Zhang XX, YAN RD, *et al.* Research on iodometric method detecting β -lactamase in milk [J]. *China Dairy Ind*, 2010, 38(12): 36–37.
- [15] 马洁, 李孝君, 薛颖. 利用酸度计检测奶制品中残留的 β -内酰胺酶[J]. *化学通报*, 2009, (4): 370–373.
Ma J, Li XJ, Xue Y. Detection of residual β -lactamase in milk by acid meter [J]. *Chemistry*, 2009, (4): 370–373.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



谢岩黎, 博士, 教授, 主要研究方向为食品营养与安全。
E-mail: ylxie2013@163.com