

杯碟法和酶热仪法检测乳及乳制品中 β -内酰胺酶类物质的比较

雷方, 周爽, 苗虹*, 赵云峰, 吴永宁

(国家食品安全风险评估中心, 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021)

摘要: 本文对 β -内酰胺酶的多重国内外检测方法进行了介绍, 并着重比较了杯碟法和酶热仪法的特点, 详细分析了两种方法在检测原理、仪器设备、实验操作、实验周期、结果判定、方法学参数等方面的异同点。杯碟法稳定可靠、灵敏度高, 是目前中国乳及乳制品中 β -内酰胺酶检测的推荐方法; 酶热仪法简便快捷、可实现半定量检测, 更适用于大规模样品筛查和现场检测。两种方法的测定结果具有可比性, 可根据检测要求和实验室情况配合使用。

关键词: β -内酰胺酶; 酶热生物传感器; 杯碟法; 牛乳

Comparison of cylinder plate method and enzyme thermistor method for detection of β -lactamase activity in milk and dairy products

LEI Fang, ZHOU Shuang, MIAO Hong*, ZHAO Yun-Feng, WU Yong-Ning

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Risk Assessment of Food Safety, Beijing 100021, China)

ABSTRACT: An overview of the determination methods for β -lactamase in milk and dairy products was presented, with discussion of the advantages and disadvantages of cylinder plate and enzyme thermistor biosensor method in detail. The advantages of reliability and sensitivity had been made the cylinder plate method a recommended strategy for β -lactamase test in China. Compared to the conventional culture-based assay, enzyme thermistor biosensor provided a rapid, simple and semi-quantification tool for routine use and on-site inspection. Both of the two methods were competent for β -lactamase analysis in milk and dairy products, showing results in a good agreement.

KEY WORDS: β -lactamase; enzyme thermistor biosensor; cylinder plate method; milk

1 引言

在乳牛养殖过程中, β -内酰胺类抗生素是治疗牛乳腺炎和其他细菌感染应用最广泛的抗生素, 同时也是牛奶中

最常见的残留抗生素之一^[1-2]。随着人们对食品安全的高度重视, 乳及乳制品中抗生素残留限量不断降低。在经济利益的驱使下, 能有效水解此类抗生素的 β -内酰胺酶被违法添加入奶制品, 以降低残留抗生素, 使不合格奶源流入乳

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局公益性行业科研专项(2012104003)

Fund: Supported by the Special Public Welfare Industry Research of the State Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine (2012104003)

*通讯作者: 苗虹, 研究员, 研究方向为食品安全理化检测与膳食暴露评估, E-mail: miaoh@cfsa.net.cn

*Corresponding author: MIAO Hong, Professor, China National Centre for Food Safety Risk Assessment, No.7 Panjiayuan Nanli, Chaoyang District, Beijing 100021, China. E-mail: miaoh@cfsa.net.cn

制品生产环节。以 β -内酰胺酶消除牛奶中抗生素残留的方法在国外早有报道^[3]。 β -内酰胺酶本身对人体的危害暂无确定的研究结论,但长期食用含有 β -内酰胺酶的奶制品,会导致人体对青霉素、头孢菌素等 β -内酰胺类抗生素耐药性增高,降低对传染病的抵抗能力,危害健康。同时, β -内酰胺酶的添加纵容了奶牛饲养和奶源储运过程中抗生素的滥用,且分解的抗生产品也为食品安全埋下隐患。因此,2009 年 2 月,由国家卫生和计划生育委员会(原卫生部)等九部门组成的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领导小组公布《食品中可能违法添加的非食用物质名单(第二批)》,其中将 β -内酰胺酶列入乳与乳制品中可能违法添加的非食用物质^[4]。

β -内酰胺酶早在 β -内酰胺类抗生素应用于临床之前就被发现,其作用是水解 β -内酰胺环,迄今已发现 400 多种。分类方法主要有两种,分子生物学方法和 BUSH 法^[5-7]。分子生物学法根据氨基酸序列将 β -内酰胺酶分为 A、B、C、D 4 类。其中 B 类为金属酶,以锌离子为活性作用位点,在奶制品添加中基本不使用;A、C、D 类酶以丝氨酸为酶的活性作用位点,尽管酶分子的一级结构差别较大,但三级结构却非常相似。所有 A 类 β -内酰胺酶均有 S70XXK73, K234TG236, S130DN132 和 Ω 环(161 → 170 或 164 → 179 位点上的氨基酸残基组成)这几个结构单元形成的腔,即为 β -内酰胺酶的活性作用腔^[8,9]。C 类酶与 A 类酶相比活性腔的结构比较松散,更适于具有较大空间位阻的底物进入^[10]。D 类酶的三级结构也有类似于 A 类酶的结构域单元,执行着类似功能^[11]。BUSH 分类法根据底物及抑制剂谱不同,将酶分为 4 类:头孢菌素酶(AmpC 酶)、青霉素酶和超广谱酶,金属酶及其他不能被克拉维酸完全抑制的青霉素酶。目前,市场上出售的用于水解牛奶中抗生素的 β -内酰胺酶制剂,主要分为两大类,分别对青霉素残留和头孢类抗生素残留有显著分解作用。

目前针对乳及乳制品中违法添加 β -内酰胺酶的检测方法按照原理分为理化法、免疫法、微生物法和生物传感器法。理化法包括酸度法^[12]、比色法、高效液相色谱法^[13](紫外检测器或质谱检测器^[14])等。理化法具有准确性好、灵敏度高、重现性好的特点^[15],高效液相色谱法也能够直接检测酶解产物判断 β -内酰胺酶的存在,但定量困难,且易出现假阳性。免疫法操作简单、特异性强、灵敏度高,无需大型仪器设备,对实验技术要求不高,实验周期短,一般为 2~5 h,可同时检测多个样品,成本低廉,便于普及和推广。但牛奶中添加的 β -内酰胺酶种类较多,无法判断出是哪类 β -内酰胺酶,这就为免疫法检测带来了相当大的难度。微生物法是常用的乳及乳制品中违法添加 β -内酰胺酶的检测方法。杯碟法是微生物法中的一种,也是目前我国推荐的方法^[16]。国家卫生和计划生育委员会(原卫生部)2009 年发布了《乳及乳制品中舒巴坦敏感 β -内酰胺酶类药物检验方法:杯碟法》^[17]。该方法采用对青霉素类药

物绝对敏感的标准菌株,利用舒巴坦特异性抑制 β -内酰胺酶的活性,并加入青霉素作为对照,通过比对加入 β -内酰胺酶抑制剂与未加入抑制剂的样品所产生的抑制圈的大小来间接测定样品中是否含有 β -内酰胺酶类药物。酶热仪法利用 β -内酰胺酶水解底物青霉素的热效应进行检测。利用 β -内酰胺酶能有效分解青霉素的性质,在待测牛奶中加入一定量青霉素,充分反应后,通过青霉素量的变化,间接测定牛奶中 β -内酰胺酶的含量。仪器配有固定 β -内酰胺酶的酶柱,当青霉素流过酶柱时,发生特异性酶解反应放热,产生信号^[18,19]。以下将从实验原理、仪器设备、实验操作、实验周期、结果判定、方法学参数、方法局限性等方面对杯碟法与酶热仪法进行详细比较和讨论。

2 检测方法

2.1 杯碟法

2.1.1 试剂和材料

试验菌种为藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*) CMCC(B)28001;标准品:青霉素对照品, β -内酰胺酶标准品,舒巴坦对照品;培养基:营养琼脂培养基,抗生素检测用培养基。

2.1.2 样品制备

将待检样品充分混匀,取 1 mL 待检样品于 1.5 mL 离心管中,共取 4 份,分别标为:A、B、C、D,每个样品做 3 个平行,共 12 管,同时每次检验应取纯水 1 mL 加入到 1.5 mL 离心管中作为对照。若样品为乳粉,则将乳粉按 1:10 的比例稀释。若样品为酸性乳制品,应调节 pH 值至 6~7。

2.1.3 样品测定

按照下列顺序分别将青霉素标准溶液、 β -内酰胺酶标准溶液、舒巴坦标准溶液加入到样品及纯水中:

A: 青霉素 G 5 μ L; B: 舒巴坦 25 μ L、青霉素 G 5 μ L; C: β -内酰胺酶 25 μ L、青霉素 G 5 μ L; D: β -内酰胺酶 25 μ L、舒巴坦 25 μ L、青霉素 G 5 μ L。

混匀后,将上述 A~D 试样各 100 μ L,加入放置于检验用平板上的 4 个无菌牛津杯中,(36 \pm 1) $^{\circ}$ C 培养 18~22 h,测量抑菌圈直径。每个样品取 3 次平行试验平均值。

2.2 酶热仪法

2.2.1 试剂和材料

试剂:磷酸二氢钾(KH₂PO₄),磷酸氢二钾(K₂HPO₄),无水乙醇;标准品: β -内酰胺酶标准品,青霉素 G 钾盐标准品(C₁₆H₁₇KN₂O₄S, CAS: 113-98-4)(纯度 \geq 98%)。

2.2.2 标准曲线

用空白样品基质稀释 β -内酰胺酶标准溶液,配制成浓度为 0、4、10 和 20 U/mL 的标准工作溶液各 10 mL,每管加入 100 μ L 青霉素标准溶液,室温翻转震荡 3 h 后,按条件进行测定。以各浓度信号峰高与 0 U/mL 工作溶液信号峰高之差为纵坐标,其对应浓度为横坐标作图,绘制标准

曲线。

2.2.3 样品的前处理

将液体乳样品充分混匀,取2 mL待检样品于5 mL具塞玻璃试管中,共取3管,分别标为:A、B、C。在B、C两管中各加入20 μ L青霉素标准溶液,A管中加入20 μ L磷酸盐缓冲溶液。涡旋20 s混匀,A、B两管马上进行检测,C管室温翻转震荡3 h后进行检测。如样品为乳粉,按1:8的比例稀释混匀后,在按液体乳处理。如样品为酸奶,则样品以12000 r/min离心5 min,取上清调节pH值至6~7后,再按液体乳处理。

2.2.4 样品的测定

将2 mL的A、B、C3管试样待测液注入酶热仪中进行测定,记录信号峰高。以B、C溶液信号峰高之差作为样品最终测定值,根据标准曲线得到待测液中 β -内酰胺酶的活性。

2.2.5 结果判定

通过对3管测试液中青霉素峰高的比较,即以B、C溶液信号峰高之差作为样品最终测定值。若A、C溶液信号峰高相同,应将样品稀释后再进行检测。对于液体样品,该浓度结果即为样品中 β -内酰胺酶活性。

3 讨论

本部分将从实验原理、仪器设备、实验操作、结果判定、方法学参数、局限性等多方面对杯碟法和酶热仪法进行比较。

3.1 实验原理

杯碟法和酶热法均通过定量添加青霉素底物,充分反应后,通过青霉素量的变化,测定牛奶中 β -内酰胺酶的含量,都属于间接法。

其中,杯碟法是依据青霉素抑制藤黄微球菌的生长,通过观察比较抑菌圈的大小来判断样品中是否存在 β -内酰胺酶。而酶热法是利用了酶柱特异性催化水解青霉素的热效应,通过传感器监控青霉素流过时的温度变化,产生热信号峰,对青霉素进行定量,进而判断 β -内酰胺酶的活性。

3.2 仪器设备

杯碟法实验过程中使用的培养箱、超净台等均为微生物实验室常规配备的仪器设备,无需另外购置特殊装置,因此方法便于普及,在通常的微生物实验室即可开展测定工作。而酶热仪法需要使用能够灵敏感测微小温度变化(10^{-5} $^{\circ}$ C)的酶热仪,并配备青霉素酶柱作为实验耗材,该仪器为非常规仪器,因此限制了该法的使用和推广。

3.3 实验操作

杯碟法的实验操作较为复杂,包括:制备培养基、样品前处理、放置牛津杯、加样、培养、抑菌圈测量等多个

步骤,对操作者的实验技术要求较高。酶热仪法只需在样品中加入一定量的青霉素标准溶液后,室温下翻转震荡3 h,无须其他处理即可直接注入酶热仪进行分析。因此,酶热仪法操作更为简单,由人员操作引入的干扰和影响较少。

3.4 实验周期

杯碟法在样品中加入青霉素后需37 $^{\circ}$ C培养18~22 h,测定一批样品用时大于1天;酶热仪法在样品中加入青霉素后只需室温振荡3 h,并在10 min内可完成仪器检测。因此,用时少是酶热仪法的重要优势之一。

3.5 结果对比

两种方法均可对乳及乳制品中 β -内酰胺酶活性进行判定,其结果具有良好的可比性^[15,18,19],准确性、重现性较好。两种方法的检出限均为4 U/mL,且判定依据有所不同。杯碟法通过4个抑菌圈大小的比较,在系统成立的基础上,对样品中 β -内酰胺酶活性进行判定,但只能给出阴性或阳性的定性结果,对于活性>4 U/mL的样品判定为阳性,活性<4 U/mL的样品判定为阴性,无法实现定量或半定量测定。

酶热仪法则采用基质加标标准曲线方法实现了对样品中 β -内酰胺酶的定量检测^[18],其线性范围为4~20 U/mL,对于活性>20 U/mL的样品,可以稀释后进行定量,方法回收率为80%~120%,RSD<15%^[19]。

3.6 方法优化

目前已有很多对杯碟法实验条件进行优化的研究。康海英等^[15]研究了指示菌浓度和培养时间对检测方法的影响,对杯碟法条件进行优化。薛晓晶等^[20]探讨了青霉素G最适使用质量浓度、舒巴坦最适使用浓度,同时指出了针对不同品牌不同来源的 β -内酰胺酶标准品,其适宜的最优条件也有差异,需根据具体情况进行详细优化。

酶热仪法的实验条件优化包括:酶热仪恒温箱工作温度、流动相、流速、加入青霉素的量、振荡反应时间等。通过延长振荡反应时间可以提高检测灵敏度,而通过改变加入青霉素的量可以调节标准曲线的线性范围。

3.7 方法局限性

杯碟法和酶热法均采用间接原理对 β -内酰胺酶活性进行测定,在原理上具有一定局限性。对于目前已知的400余种 β -内酰胺酶,酶热仪法仅能检测其中可催化水解青霉素的部分 β -内酰胺酶;杯碟法仅能检测既可催化青霉素水解,又对舒巴坦敏感的一部分 β -内酰胺酶,因此存在检测结果假阴性的问题。此外,若样品中存在其他一些有相似功能的物质,则同样会被这两种方法检出,由此可能造成检测结果的假阳性。

以上从7个方面对杯碟法和酶热仪法进行了详细阐述,其特点总结列于表1中,二者各有优势,又相互补充,均可满足乳及乳制品中 β -内酰胺酶的检测。

表 1 杯碟法和酶热仪法的比较
Table 1 Comparison of cylinder plate method and enzyme thermistor method

| 项目 | 杯碟法 | 酶热仪法 |
|------|---|--|
| 原理 | 间接法(抑菌圈) | 间接法(放热) |
| 仪器设备 | 培养箱(常规设备) | 酶热仪(非常规仪器) |
| 实验操作 | 较复杂 | 简单 |
| 检测周期 | 1 d 以上 | 3 ~ 4 h |
| 定性 | 能 | 能 |
| 定量 | 不能 | 4~20 U/mL 定量, >20 U/mL 稀释后定量 |
| 灵敏度 | 4 U/mL | 4 U/mL |
| 局限性 | 检测的 β -内酰胺酶种类: 对舒巴坦敏感, 且能水解青霉素底物的 β -内酰胺酶 | 检测的 β -内酰胺酶种类: 能水解青霉素底物的 β -内酰胺酶 |

4 结 论

本研究对乳及乳制品中 β -内酰胺酶检测的杯碟法和酶热仪法进行了详细比较。杯碟法和酶热仪法均可满足乳及乳制品中 β -内酰胺酶的检测。二者各有优势, 又相互补充。杯碟法稳定可靠、易于普及推广, 是目前我国乳及乳制品中 β -内酰胺酶检测的推荐方法; 酶热仪法简便快捷、可实现半定量检测, 更适合于大规模样品筛查和现场检测。各实验室可以根据检测要求、实验室配备情况等选择使用。

参考文献

- [1] Stead SL, Ashwin H, Richmond SF, *et al.* Evaluation and validation according to international standards of the Delvotest (R) SP-NT screening assay for antimicrobial drugs in milk [J]. *Int Dairy J*, 2008, 18: 3–11.
- [2] Ashwin HM, Stead SL, Taylor JC, *et al.* Development and validation of screening and confirmatory methods for the detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide using SPR biosensor and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 529: 103–108.
- [3] Koryckadahl M, Richardson T, Bradley RL. Use of microbial beta-lactamase to destroy penicillin added to milk[J]. *J Dairy Sci*, 1985, 68: 1910–1916.
- [4] 中华人民共和国卫生部[EB/OL]. <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohwsjdj/s3594/200902/38987.htm> Ministry of health of PRC[EB/OL]. <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohwsjdj/s3594/200902/38987.htm>
- [5] Medeiros AA. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics [J]. *Clin Infect Dis*, 1997, 24 (S): 19–45.
- [6] Bush K. New β -lactamase in gram-negative bacteria diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy [J]. *Antimicrob Resist*, 2001, 32: 1085–1089.
- [7] Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases [J]. *Antimicrob Agents Chemoth*, 2010, 54 (3): 969–976.
- [8] Matagne A, Frere JM. Contribution of mutant analysis the case of class A β -lactamases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1246: 109–127.
- [9] Jelsch C, Moarey L, Masson JM, *et al.* Crystal structure of Escherichia coli TEM-1 beta-lactamases at 1.8Å resolution [J]. *Proteins*, 1993, 16: 364–368.
- [10] 陈炫, 范昕建, 吕晓菊. β -内酰胺酶的分类及构效关系研究进展[J]. *中国药科大学学报*, 2003, 34 (4): 380–384. Chen X, Fan XJ, Lv XJ. Progress of the classification of β -lactamases and its relationship between structure and function [J]. *J China Pharm Univ*, 2003, 34 (4): 380–384.
- [11] Sanschagrin F, Couture F, Levesque RC. Primary structure of OXA-3 and phylogeny of oxacillin-hydrolyzing class D β -lactamases [J]. *Antimicrob Agent Hemother*, 1995, 39: 887–892.
- [12] Ikryannikova LN, Shitikov EA, Zhivankova DG, *et al.* A MALDITOF MS-based minisequencing method for rapid detection of TEM-type extended-spectrum beta-lactamases in clinical strains of enterobacteriaceae[J]. *J Microbiol Meth*, 2008, 75: 385–391.
- [13] 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 the rapid determination of β -lactamase residue in milk [J]. *Food Sci*, 2010, 31 (10): 216–218.
- [14] Jorgensen JH, Lee JC, Alexander GA. Rapid penicillinase paper strip test for detection of beta-lactamase-producing hemophilus-influenzae and Neisseria-Gonorrhoeae[J]. *Antimicrob Agents Chemoth*, 1977, 11: 1087–1088.
- [15] 康海英, 王加启, 卜登攀, 等. 两种检测生鲜乳中 β -内酰胺酶方法的比较[J]. *生物技术通报*, 2010, 26 (6): 202–205. Kang HY, Wang JQ, Bu DP, *et al.* Comparison of unisensor kit and cylinder plate methods to detect β -lactamase in raw milk[J]. *Biotechnol Bull*, 2010, 26 (6): 202–205.
- [16] Cui SH, Li JY, Hu CQ, *et al.* Development of a method for the detection of beta-lactamases in milk samples[J]. *J AOAC Int*, 2007, 90: 1128–1132.

- [17] 卫监督发〔2009〕44号:关于印发乳及乳制品中舒巴坦敏感 β -内酰胺酶类药物检验方法:杯碟法的通知[B].卫生部,2009.
Sanitary supervision (2009) No. 444: Notice on printing and issuing the cylinder plate method for detection of β -lactamase in milk and dairy products [B]. Ministry of Health of PRC, 2009.
- [18] Zhou S, Zhao YF, Mecklenburg M, *et al.* A novel thermometric biosensor for fast surveillance of β -lactamase activity in milk[J]. Biosens Bioelectron, 2013, 49: 99–104.
- [19] 周蕊, 丁颖, 周爽, 等. 我国部分地区市售巴氏杀菌乳中 β -内酰胺酶含量调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26 (3): 209–211.
Zhou R, Ding H, Zhou S, *et al.* Investigation of β -lactamases activity in milk in parts of China [J]. Chin J Food Hyg, 2014, 26 (3): 209–211.
- [20] 薛晓晶, 李玲, 金涌, 等. 杯碟法检测乳中的 β -内酰胺酶[J]. 食品科学, 2011, 32(4): 216–219.
Xue XJ, Li L, Jin Y, *et al.* Detection of β -lactamase in milk based on cylinder plate method [J]. Food Sci, 2011, 32 (4): 216–219.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



雷方, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全理化检测技术。
E-mail: 920346202@qq.com



苗虹, 研究员, 研究方向为食品安全理化检测与膳食暴露评估。
E-mail: miaoh@cfsa.net.cn