



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114088626 B

(45) 授权公告日 2022.08.26

(21) 申请号 202111353273.0

(22) 申请日 2021.11.16

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114088626 A

(43) 申请公布日 2022.02.25

(73) 专利权人 国家食品安全风险评估中心
地址 100022 北京市朝阳区广渠路37号院2
号楼

专利权人 北京中检葆泰生物技术有限公司

(72) 发明人 杨大进 刘龙飞

(74) 专利代理机构 北京蕙识同联专利代理事务
所(特殊普通合伙) 11966
专利代理师 刘晔

(51) Int. Cl.

G01N 21/01 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

(56) 对比文件

- CN 105445393 A, 2016.03.30
- IN 942DEL2012 A, 2014.11.28
- CN 111272726 A, 2020.06.12
- CN 108254560 A, 2018.07.06
- CN 110501317 A, 2019.11.26
- CN 104263831 A, 2015.01.07
- US 5330900 A, 1994.07.19
- US 4978614 A, 1990.12.18
- CN 112067601 A, 2020.12.11

US 2014308661 A1, 2014.10.16

US 5525473 A, 1996.06.11

张昊.乳及乳制品中碱性磷酸酶和乳过氧化物酶活性检测方法的评估及应用.《中国优秀硕士学位论文全文数据库工程科技I辑》.2019,(第9期),

SCINTU, M. F. 等.Evaluation of Spectrophotometric and Fluorometric Methods for Alkaline Phosphatase Activity Determination in Ewe's Milk.《Journal of Food Protection》.2000,第63卷(第9期),

Payne C 等.Alkaline phosphatase activity in pasteurized milk: A quantitative comparison of Fluorophos and colourimetric procedures.《International journal of dairy technology》.2009,第62卷(第3期),

Stanley P E..Commercially available luminometers and imaging devices for low-light level measurements and kits and reagents utilizing bioluminescence or chemiluminescence: Survey update 5.《Journal of bioluminescence and chemiluminescence》.1998,第12卷(第2期),

(续)

审查员 汪柳婷

权利要求书1页 说明书9页 附图2页

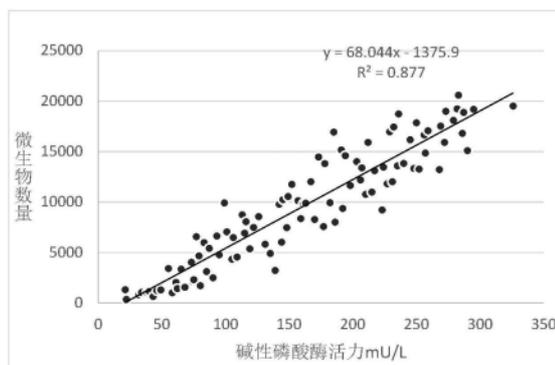
(54) 发明名称

一种鉴定巴氏杀菌乳的方法及检测系统

(57) 摘要

本申请提供一种鉴定巴氏杀菌乳的方法及检测系统。该方法和系统通过检测巴氏杀菌乳中碱性磷酸酶的活性判断微生物的杀灭程度,不仅灵敏性高,而且检测结果准确、稳定性好。

CN 114088626 B



[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

Philip E. Stanley..A survey of some commercially available kits and reagents which include bioluminescence or chemiluminescence for their operation: Including immunoassays, hybridization, labels, probes, blots and ATP-based rapid microbiology.《Products from more than forty companies》.1993,第8卷(第2期),

Sarver R, 等.A portable chemiluminescence assay of alkaline phosphatase activity to monitor pasteurization of milk products.《Journal of food protection》.2019,第82卷(第12期),

杨大进 等.交链孢毒素在Caco-2细胞中的转运与吸收.《山东大学学报(医学版)》.2015,第53卷(第6期),

Rola J G 等.Determination of alkaline phosphatase activity in milk and milk products by fluorimetric method.《Bull Vet Inst Pulawy》.2010,第54卷

Jong, E. A. M. de 等.Fluorimetric assay of alkaline phosphatase in milk products.《Voedingsmiddelen Technologie》.1993,第26卷(第23期),

刘连生.酶免疫分析技术研究进展.《湖北省卫生职工医学院学报》.2000,(第1期),

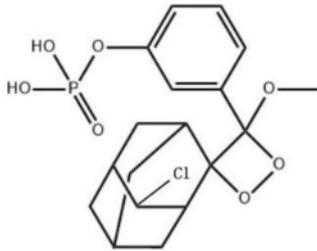
惠永华.乳中ALP、LPO、 γ -GGT检测方法的建立.《中国优秀硕士学位论文全文数据库工程科技I辑》.2008,(第10期),

申军士等.乳中碱性磷酸酶活性测定方法研究进展.《中国乳品工业》.2009,第37卷(第06期),第31-34页.

1. 一种鉴定巴氏杀菌乳的方法, 其特征在于, 包括通过定量检测碱性磷酸酶的活性来判断微生物被杀灭的程度, 所述碱性磷酸酶与底物化合物反应产生荧光, 碱性磷酸酶活性与荧光强度的关系以函数 $F(x)$ 表示, $F(x) = \frac{x}{30} - \frac{A-D}{[1+(E+C)^B]}$, 与A、B、C、D、E五个参数相关, 其中A为100份阳性质控样品所获得的荧光强度的中位数, 阳性质控的碱性磷酸酶活性为350mU/L, 变异度为30%; B为校准因子; C为100份经过72°C 15s热处理的、微生物含量低于20000CFU/ml的巴氏杀菌乳所获得的荧光强度中位数; D为100份阴性巴氏杀菌乳样品所获得的荧光强度的中位数; E为100份经过85°C 1s热处理的牛乳所获得的荧光强度的中位数; 通过标准品的碱性磷酸酶的活性与反应的荧光强度来确定B值;

当巴氏杀菌乳中微生物含量低于20,000cfu/ml时, 荧光强度与碱性磷酸酶的活性符合函数 $F(x)$, 且微生物含量与碱性磷酸酶活性呈正相关; 荧光强度越高表明碱性磷酸酶活性越高, 相应的, 微生物含量也越高;

所述底物化合物的结构如式I所示:



式 I。

2. 如权利要求1所述的方法, 其特征在于, 当碱性磷酸酶活性 $< 50\text{mU/L}$ 时, 表明可能存在过度加热的情况, 初步判断为非巴氏灭菌乳。

3. 如权利要求1或2所述的方法, 其特征在于, 所述方法还包括检测乳铁蛋白、 α -乳白蛋白和/或 β -乳球蛋白的含量。

4. 如权利要求3所述的方法, 其特征在于, 当所述乳铁蛋白的含量大于等于25mg/L, 所述 α -乳白蛋白的含量大于500mg/L, 和/或所述 β -乳球蛋白的含量大于等于2200mg/L时, 初步判断为巴氏杀菌乳。

一种鉴定巴氏杀菌乳的方法及检测系统

技术领域

[0001] 本申请涉及一种鉴定巴氏杀菌乳的方法及检测系统,属于生化检测领域。

背景技术

[0002] 牛奶,被誉为“白色血液”,其主要成分有水、脂肪、蛋白质、乳糖及丰富的矿物质等,可以为人体提供大量营养物质,但其中也存在很多致病微生物,只有经过热加工处理使这些微生物失去其致病性,牛奶才能成为人类的食物及饮用来源。牛奶的杀菌方式主要包括巴氏杀菌和超高温灭菌,巴氏杀菌通常为72℃加热15秒,在杀灭致病菌的同时可尽可能保留牛奶中的活性物质,因此巴氏杀菌乳得到越来越多消费者的青睐。巴氏杀菌乳国家标准明确规定了微生物限量,因此需要检测巴氏杀菌乳中的微生物含量。传统的微生物检测方法为平板培养法,操作复杂,对操作人员技术水平要求高,检测速度慢,需48小时出结果,而巴氏杀菌奶的保质期通常为7天,对于短保质期产品来说,检测时间长意味着大大缩短了产品的保质期;目前市场上的微生物检测片大大减少了操作难度,但检测时间仍然很长,通常为24小时-48小时,检测速度仍然很慢,不适用于短保质期产品。鉴于上述情况,开发能够快速检测巴氏杀菌乳微生物杀灭程度的方法非常必要。

[0003] 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)是牛奶中天然存在的一种酶,也是牛奶中热稳定性较强的酶,它对温度的稳定性比乳中存在的致病菌略高,当巴氏杀菌乳中微生物的含量低于20000CFU/ml时,碱性磷酸酶的活性与微生物含量成正相关,因此可通过碱性磷酸酶的活性判断对微生物的杀灭程度。

[0004] 目前,检测碱性磷酸酶活性的方法主要采用使荧光底物化合物与碱性磷酸酶反应产生荧光,通过荧光检测仪检测出碱性磷酸酶的活性。然而,这种方法受到至少两方面的限制:一是荧光底物化合物的灵敏性;二是碱性磷酸酶活性测算方法的准确性。

发明内容

[0005] 为了能够快速检测巴氏杀菌乳中微生物的杀灭程度,本申请提供一种鉴定巴氏杀菌乳的方法及检测系统。

[0006] 本申请的目的之一在于提供一种碱性磷酸酶与荧光强度的换算方法。

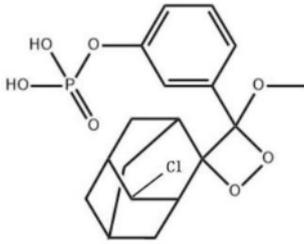
[0007] 碱性磷酸酶活性与荧光强度的关系以函数 $F(x)$ 表示,
$$F(x) = \frac{x}{30} - \frac{A-D}{[1+(E+C)^B]}$$
与A、B、C、D、E五个参数相关,其中A为100份阳性质控样品所获得的荧光强度的中位数,阳性质控的碱性磷酸酶活性为350mU/L,变异度为30%;B为校准因子;C为100份经过72℃15s热处理的微生物含量低于20000CFU/ml的巴氏杀菌乳所获得的荧光强度中位数;D为100份阴性巴氏杀菌乳样品所获得的荧光强度的中位数;E为100份经过85℃1s热处理的牛乳所获得的荧光强度的中位数。

[0008] 通过标准品的碱性磷酸酶的活性(mU/L)与反应的荧光强度(RLU)来确定B值。

[0009] 当巴氏杀菌乳中微生物含量低于20,000cfu/ml时,荧光强度(RLU)与碱性磷酸酶

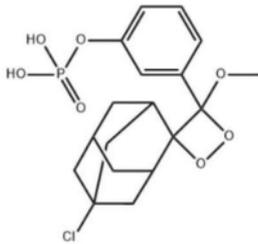
的活性符合函数 $F(x)$,且微生物含量与碱性磷酸酶活性呈正相关。

[0010] 本申请的另一目的在于提供一种高灵敏度的碱性磷酸酶的底物化合物(如式I)。所述化合物相对于常规的碱性磷酸酶底物化合物(式II)灵敏度更高。



式 I

[0011]



式 II。

[0012] 为了实现上述目的,本申请采用一种检测系统,所述系统由试剂盒和检测仪组成;所述试剂盒由检测管和校准片组成;所述检测仪主要包括高灵敏的光电倍增管、内置温度探针稳定器、信号收集器、和计算软件。

[0013] 检测仪根据测算方法直接将读取的荧光强度(RLU),转换为碱性磷酸酶的活性(mU/L)。

[0014] 当碱性磷酸酶活性 $<350\text{mU/L}$ 时,微生物的量 $<20,000\text{CFU/mL}$ 。

[0015] 当碱性磷酸酶活性为 $50\text{-}150\text{mU/L}$ 时,微生物的量约为 $1000\sim 10000\text{CFU/mL}$ 。

[0016] 当碱性磷酸酶活性 $<50\text{mU/L}$ 时,表明可能存在过度加热的情况,初步判断为非巴氏杀菌乳。

[0017] 初步判断为巴氏杀菌乳的标准还可以包括:乳铁蛋白的含量大于等于 25mg/L ; α -乳白蛋白的含量大于 500mg/L ,和/或 β -乳球蛋白的含量大于等于 2200mg/L 。

[0018] 本申请的检测系统还采用高灵敏的光电倍增管,其与普通光电倍增管相比,灵敏度更高;同时采用了内置温度探针稳定器,其可确保反应液的温度符合要求,从而保证检测结果的准确性和稳定性。

附图说明

[0019] 图1碱性磷酸酶活性与微生物含量的关系。

[0020] 图2荧光强度与碱性磷酸酶活性的关系。

[0021] 图3巴氏灭菌乳中乳铁蛋白的含量范围。

[0022] 图4巴氏灭菌乳中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的含量范围。

具体实施方式

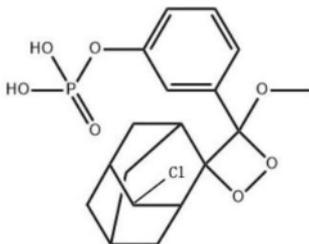
[0023] 下面参考附图来说明本申请的实施例。在本申请的一个附图或一种实施方式中描述的元素和特征可以与一个或多个其他附图或实施方式中示出的元素和特征相结合。应当注意,为了清楚的目的,附图和说明中省略了与本申请无关的、本领域普通技术人员已知的部件或处理的表示和描述。下面结合附图对本申请做进一步描述。

[0024] 第一方面,本申请提供一种鉴定巴氏杀菌乳的方法,包括通过定量检测碱性磷酸酶的活性来判断微生物被杀灭的程度,所述碱性磷酸酶与底物化合物反应产生的荧光,碱性磷酸酶活性与荧光强度的关系以函数 $F(x)$ 表示,
$$F(x) = \frac{x}{30} - \frac{A-D}{[1+(E+C)^B]}$$
,与A、B、C、D、E

五个参数相关,其中A为100份阳性质控样品所获得的荧光强度的中位数,阳性质控碱性磷酸酶活性为350mU/L,变异度为30%;B为校准因子;C为100份经过72°C 15s热处理的微生物含量低于20000CFU/ml的巴氏杀菌乳所获得的荧光强度中位数;D为100份阴性巴氏杀菌乳样品所获得的荧光强度的中位数;E为100份经过85°C 1s热处理的牛乳所获得的荧光强度的中位数;通过标准品的碱性磷酸酶的活性(mU/L)与反应的荧光强度(RLU)来确定B值;

[0025] 当巴氏杀菌乳中微生物含量低于20,000cfu/ml时,荧光强度与碱性磷酸酶的活性符合函数 $F(x)$,且微生物含量与碱性磷酸酶活性呈正相关;荧光强度越高表明碱性磷酸酶活性越高,相应的,微生物含量也越高。

[0026] 在一些实施例中,底物化合物的结构如式I所示:



[0027]

式 I。

[0028] 在一些实施方式中,当碱性磷酸酶活性 $< 50\text{mU/L}$ 时,表明可能存在过度加热的情况,初步判断为非巴氏灭菌乳。

[0029] 在一些实施方式中,上述方法还包括检测乳铁蛋白、 α -乳白蛋白和/或 β -乳球蛋白的含量。

[0030] 在一些实施方式中,初步判断为巴氏杀菌乳的标准为:乳铁蛋白的含量大于等于25mg/L; α -乳白蛋白的含量大于500mg/L,和/或 β -乳球蛋白的含量大于等于2200mg/L。

[0031] 第二方面,本申请提供一种实施前述方法的检测系统,所述系统由试剂盒和检测仪组成;所述试剂盒由检测管和校准片组成;所述检测仪主要包括高灵敏的光电倍增管、内置温度探针稳定器、信号收集器、和计算软件。

[0032] 在一些实施方式中,校准片的制备方法包括将已知碱性磷酸酶活性的生乳制成片剂,使碱性磷酸酶活性为 $875\mu\text{U} \pm 26\mu\text{U}$ 。

[0033] 在一些实施方式中,检测管的制备方法包括:

- [0034] 1) 称量69.1125g荧光底物化合物,23.438g二乙氨基乙醇、
 [0035] 10g 2'-氟-2'-脱氧肌苷,加入约400ml去离子水中,搅拌溶解;
 [0036] 2) 称量20.33g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$,加入100ml去离子水中,搅拌溶解,获得1mol/L的氯化镁溶液;
 [0037] 3) 移取0.5ml 1mol/L的氯化镁溶液至1) 溶液中;
 [0038] 4) 用去离子水定容至1L,用HCl溶液将pH调至9.7-10.3;
 [0039] 5) 以0.5ml为单位分装至塑料检测管中,并用铝箔密封。

[0040] 在一些实施方式中,检测仪的波长为540nm。

[0041] 第三方面,本申请提供一种应用前述系统定量检测碱性磷酸酶的方法,包括如下步骤:

- [0042] 1) 将待测乳品加入检测管中;
 [0043] 2) 混合检测管中的内容物,然后连接适配器;
 [0044] 3) 将检测管竖直插入检测仪,读取结果。

[0045] 实施例1研究碱性磷酸酶与微生物的关系

[0046] 1. 碱性磷酸酶检测试剂(检测管)的制备

[0047] 1) 称量69.1125g荧光底物化合物(式I),23.438g二乙氨基乙醇、10g 2'-氟-2'-脱氧肌苷,加入约400ml去离子水中,搅拌溶解。

[0048] 2) 称量20.33g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$,加入100ml去离子水中,搅拌溶解,获得1mol/L的氯化镁溶液。

[0049] 3) 移取0.5ml 1mol/L的氯化镁溶液至1) 溶液中。

[0050] 4) 用去离子水定容至1L,用HCl溶液将pH调至9.7-10.3。

[0051] 以0.5ml为单位分装至塑料检测管中,并用铝箔密封。

[0052] 2. 巴氏杀菌乳中碱性磷酸酶检测

[0053] 选取100份巴氏杀菌乳样品,采用本申请所述方法检测其碱性磷酸酶活性,同时采用国标方法检测其微生物含量。以碱性磷酸酶活性为横坐标,微生物含量为纵坐标绘制曲线。检测结果见图1。

[0054] 由图1可见,巴氏杀菌乳中碱性磷酸酶的活性与微生物含量成正相关,相关系数 $R^2 = 0.877$ 。因此,可以通过检测碱性磷酸酶活性来判断巴氏杀菌乳的微生物杀灭程度。

[0055] 实施例2碱性磷酸酶的活性与反应的荧光强度之间函数关系的换算方法

[0056] 碱性磷酸酶的活性(mU/L)与反应的荧光强度(RLU)虽然具有相关性,但并不是简单的 $y = ax + b$ 关系,导致实际检测中难以将二者的测定结果合成科学的拟合曲线。为解决该技术问题,发明人提出如下公式,能根据荧光强度更准确地换算出碱性磷酸酶的活性:

[0057]
$$F(x) = \frac{x}{30} - \frac{A-D}{[1+(E+C)^B]} \circ$$

[0058] 上述公式中,A、B、C、D、E的数值可以参照本实施例的方法进行确定。

[0059] 分别采用本申请所述方法检测100份阳性质控样品(碱性磷酸酶活性为350mU/L)、100份经过72℃15s热处理的微生物含量低于20000CFU/ml的巴氏杀菌乳、100份阴性巴氏杀菌乳样品和100份经过85℃1s热处理的牛乳,检测结果见表1-5。

[0060] 表1阳性质控检测结果(RLU)

[0061]

10261	9476	10507	9657	8495	10471	10451	9027	8613	10711
9969	8162	9959	9556	8837	10346	8762	10491	8711	10971
9699	8861	8408	10914	8788	8033	8237	10489	8478	10677
9040	9547	8261	9770	8899	10207	10185	8838	10851	9473
8409	10021	10566	9667	8620	8957	10429	10665	10096	9035
9408	10193	9548	10079	10122	9484	9304	9299	8190	10258
10839	9646	9911	10995	9011	9768	10807	10838	9586	8550
8334	9706	9063	9100	8636	8318	10416	8712	10915	8553
9219	10756	9126	10835	10899	9145	9136	8111	8344	9090
10199	10366	9982	9472	8714	8220	10937	8099	9770	10718

[0062] 由表1可见,100份阳性质控检测结果为8033-10995,平均值为9563,所有检测结果均在平均值的 $\pm 30\%$ 范围内,中位数为9552。因此,A值为9552。

[0063] 表2 72℃15s热处理巴氏杀菌乳检测结果 (RLU)

[0064]

2204	4352	5872	4490	5529	4676	1980	5748	3874	2624
2813	3532	3204	2983	4583	5525	2044	3419	5177	4020
3052	3879	1069	1953	458	5667	5842	2982	587	487
4067	968	3855	4917	1979	1414	4311	1408	2623	1603
1164	2879	433	5994	4502	4969	4697	1092	4222	266
1639	5115	4626	4927	4224	4691	5710	5328	4452	1165
5561	4432	349	1388	5668	3445	661	5449	4565	3856
757	4970	978	4270	3511	4388	5375	5154	5742	5791
2926	5934	735	1024	1268	2512	3834	3184	2575	210
3530	2504	4210	4707	419	1216	583	4380	960	5701

[0065] 由表2可见,100份经过72℃15s热处理的微生物含量低于20000CFU/ml的巴氏杀菌乳,检测结果的中位数为3683。因此,C值为3683。

[0066] 表3阴性巴氏杀菌乳样品的检测结果 (RLU)

[0067]

138	87	91	121	156	91	103	110	148	121
141	109	148	139	144	152	93	144	110	146
144	91	109	100	84	152	151	105	128	135
146	137	121	114	138	148	128	116	116	147
122	98	98	111	140	127	106	126	133	120
142	105	143	126	150	104	98	90	119	120
110	85	155	149	109	106	146	151	133	140
90	154	102	138	111	115	121	117	155	134
89	134	120	156	97	156	124	104	132	104
92	155	90	116	153	128	153	115	111	114

[0068] 由表3可见,100份阴性巴氏杀菌乳样品检测结果的中位数为121,因此,D值为121。

[0069] 表4 85℃1s热处理的牛乳的检测检测结果 (RLU)

[0070]	2641	3459	2950	1569	5382	2112	4693	2282	236	5246
	5092	3818	5530	5715	2756	1510	1908	998	5763	1924
	1899	5861	2460	2398	3725	1057	390	4203	4374	4073
	5388	5340	319	2601	2556	5903	3888	3287	4154	713
	784	4527	1988	2012	3129	3390	849	2524	2677	4083
	3570	2482	5891	5587	1542	3101	4429	1900	4444	2424
	753	4768	3454	3349	1599	737	5053	309	4449	2479
	5214	2196	2429	3428	2513	1880	546	2354	3843	541
	839	5353	5712	3180	5522	5218	5103	279	2286	4818
	4216	4737	226	1744	2643	4981	5005	751	5697	1814

[0071] 由表4可见,100份经过85℃1s热处理的牛乳检测结果的中位数为3025.5,因此,E值为3025.5。

[0072] 通过标准品的碱性磷酸酶的活性 (mU/L) 与反应的荧光强度 (RLU) 来确定B值。每次检测前,首先检测阴性巴氏杀菌乳、阴性巴氏杀菌乳的加标样品,加标样品的碱性磷酸酶活力分别为175mU/L和350mU/L,每一浓度检测3个平行,结果取平均值。分别根据0mU/L、175mU/L和350mU/L的检测结果,在公式 $F(x) = \frac{x}{30} - \frac{A-D}{[1+(E+C)^B]}$ 中代入前述各参数的数值,计算出校准因子B,B值应在平均值的±20%范围内,取3个浓度B值的平均值作为校准因子。检测结果见表5。

[0073] 表5B值计算表

[0074]	酶活力	检测结果 RLU			平均值	B 值
	mU/L	1	2	3		
	0	373	371	389	378	0.751
[0075]	175	5580	5710	5608	5633	0.750
	350	10887	10893	10976	10919	0.739
	平均值					0.747

[0076] 由表5可见,根据0mU/L、175mU/L和350mU/L所获得B值的平均值为0.747。因此,B值为0.747。

[0077] 实施例3发光强度 (RLU) 与碱性磷酸酶活性的关系

[0078] 采用本申请所述方法检测微生物含量低于20000cfu/ml的阴性牛奶的碱性磷酸酶加标样品,加标浓度分别为0、22、44、66、88、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375mU/L,每个浓度检测3个平行,以碱性磷酸酶活性为横坐标,荧光强度为纵坐标绘制曲线,结果见图2。

[0079] 由图2可见,当样品中微生物含量低于20000CFU/ml时,荧光强度与碱性磷酸酶活性呈一定的正相关。

[0080] 实施例4高灵敏荧光底物化合物与常见荧光底物对灵敏度的影响

[0081] 分别采用本申请所述高灵敏荧光底物化合物(式I)和碱性磷酸酶常规荧光底物(式II)检测20份阴性样品,计算平均值(AVG)和标准偏差(SD),再按照AVG加上3倍SD计算检测限(LOD),结果见表6。

[0082] 表6本申请荧光底物化合物与常规荧光底物灵敏度

阴性样品	检测值 (mU/L)	
	本申请荧光底物	常规荧光底物
[0083] AVG	4.2	10.3
SD	5.3	8.2
LOD	20.0	35.0

[0084] 由表6可见,本方法的检测限为20.2mU/L,采用常规荧光底物的检测限为35.0mU/L,因此采用本申请所述荧光底物化合物的灵敏度明显高于常规荧光底物。

[0085] 实施例5高灵敏光电倍增管与光电二极管对灵敏度的影响

[0086] 分别采用本申请所述检测仪和含有光电二极管的检测仪检测20份阴性样品,计算平均值(AVG)和标准偏差(SD),再按照AVG加上3倍SD计算检测限(LOD),检测结果见表7。

[0087] 表7光电倍增管与二极管灵敏度对比

阴性样品	检测值 (mU/L)	
	光电倍增管	光电二极管
[0088] AVG	4.35	12.3
SD	5.2	12.6
LOD	20.0	50.1

[0089] 由表7可见,本方法的检测限为20.0mU/L,采用二极管的检测仪的检测限为50.1mU/L,因此采用光电倍增管的检测仪的灵敏度明显高于采用二极管的检测仪。

[0090] 实施例6研究本申请的方法测定碱性磷酸酶的准确度

[0091] 采用本申请所述方法检测巴氏杀菌乳的加标样品,使样品中碱性磷酸酶活性为20mU/L、60mU/L、100mU/L、350mU/L和500mU/L五个浓度水平,每个浓度水平进行6次重复试验,检测结果见表8。

[0092] 表8碱性磷酸酶检测准确度

加标浓度 (mU/L)	检测结果 (mU/L)						平均值 (mU/L)	CV (%)	准确率 (%)
	1	2	3	4	5	6			
20	22	19	22	18	19	21	20.17	8.54	100.83
[0093] 60	57	63	59	56	55	58	58.00	4.88	96.67
100	96	94	102	98	97	92	96.50	3.57	96.50
350	369	367	313	358	361	345	352.17	5.96	100.62
500	523	506	485	536	511	542	517.17	4.06	103.43

[0094] 由表8可见,碱性磷酸酶检测的准确率为96.50%~103.43%,变异系数为3.57%~8.54%。

[0095] 实施例7研究本申请的方法测定碱性磷酸酶的精密度

[0096] 采用本申请制备的3批次试剂盒检测巴氏杀菌乳的加标样品,使碱性磷酸酶的浓度分别为60mU/L、100mU/L和350mU/L,每个浓度水平进行6次重复试验,结果取平均值,检测结果见表9。

[0097] 表9不同批次碱性磷酸酶检测结果

样品 加标	加标浓度, mU/L	批次 1	批次 2	批次 3	平均值	CV%
[0098] 1	60	58	63	64	61.67	5.21
2	100	97	99	103	99.67	3.07
[0099] 3	350	341	362	355	352.67	3.03

[0100] 由表9可见,3批次本申请制备的试剂盒测定3个浓度碱性磷酸酶的变异系数为3.03-5.21%,均低于10%,表明精密度高。

[0101] 实施例8研究内置温度探针稳定器对结果稳定性的影响

[0102] 采用本申请所述试剂盒,分别采用本申请所述检测仪和去掉内置温度探针稳定器的检测仪检测5份巴氏杀菌乳样品,每个样品做5个平行,检测结果见表10。

[0103] 表10本申请检测仪及去掉温度控制器的检测仪的检测结果的检测结果

样品	本申请所述检测仪			去掉内置温度探针稳定器的检测仪		
	平均值	SD	CV%	平均值	SD	CV%
1	37.8	2.39	6.32	37.8	10.64	28.15
2	147.0	6.44	4.38	139	35.45	25.50
3	89.8	5.40	6.02	87.8	22.65	25.80
4	214.6	6.35	2.96	181.6	46.12	25.39
5	166.0	6.12	3.69	171.4	30.44	17.76
平均值			4.67			24.52

[0105] 由表10可见,本申请所述检测仪的变异系数为2.96-6.32%,平均变异系数为4.67%;去掉内置温度探针稳定器的检测仪的变异系数为17.76-28.15%,平均变异系数为24.52%。因此,本申请所述包含内置温度探针稳定器的检测仪所获得结果的稳定性明显高于去掉温度控制器的检测仪。

[0106] 实施例9研究巴氏杀菌乳中活性蛋白的含量

[0107] 选择严格采用巴氏杀菌工艺生产的80份巴氏杀菌乳样品,采用ELISA方法检测其中的乳铁蛋白、 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的含量,每个样品做3个平行,结果取平均值。检测结果见图3和图4。

[0108] 由图3可见,巴氏杀菌乳中乳铁蛋白的含量均大于等于25mg/L;由图4可见,巴氏杀菌乳中 α -乳白蛋白的含量均大于500mg/L, β -乳球蛋白的含量均大于等于2200mg/L。

[0109] 本申请的方法和系统采用高灵敏的荧光底物化合物,其与碱性磷酸酶反应发出荧光,检测仪的软件利用准确的算法将荧光强度[以相对发光单位(RLU)表示]转换为碱性磷酸酶的活性(mU/L),结合检测仪中高灵敏的光电倍增管,提高了检测灵敏度和准确性;而且,整个检测过程无需样品制备,操作非常简单,45秒可完成检测;标准品(校准片)以生乳为基质,增加检测结果的准确性,并且校准片为固体,易于保存,使酶活保持稳定;检测仪中内置的温度探针稳定器可确保反应液的温度符合要求,从而保证检测结果的准确性和稳定性。

[0110] 虽然已经详细说明了本申请及其优点,但是应当理解在不超出由所附的权利要求所限定的本申请的精神和范围的情况下可以进行各种改变、替代和变换。而且,本申请的范围不仅限于说明书所描述的过程、设备、手段、方法和步骤的具体实施例。本领域内的普通技术人员从本申请的公开内容将容易理解,根据本申请可以使用执行与在此所述的相应实施例基本相同的功能或者获得与其基本相同的结果的、现有和将来要被开发的过程、设备、手段、方法或者步骤。因此,所附的权利要求旨在它们的范围内包括这样的过程、设备、手段、方法或者步骤。

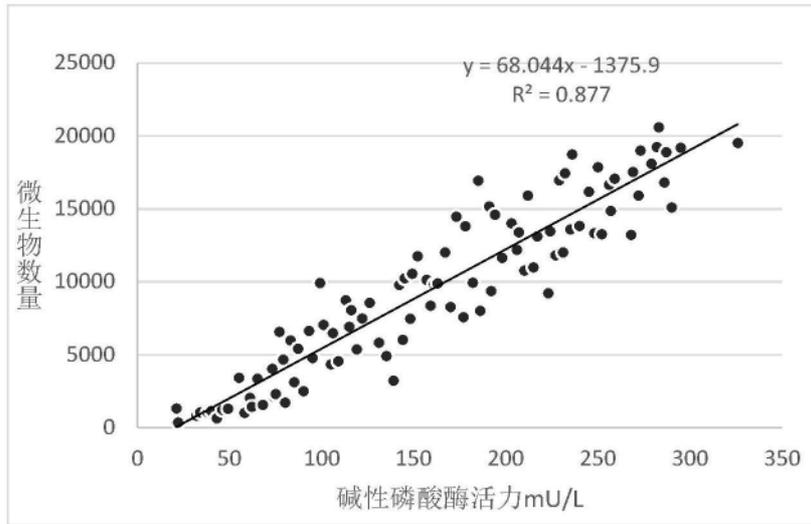


图1

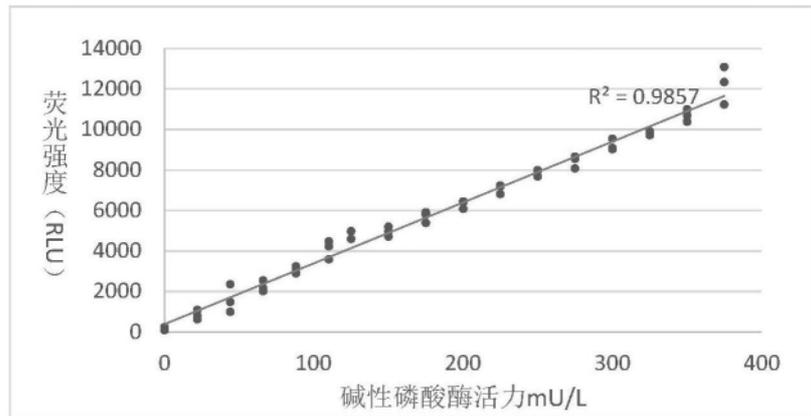


图2

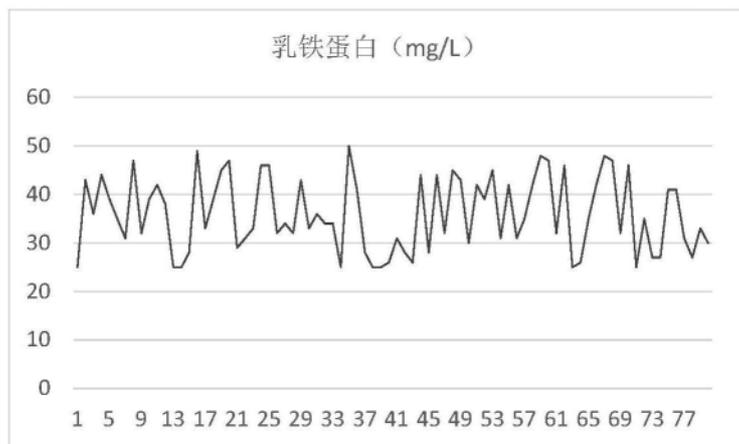


图3

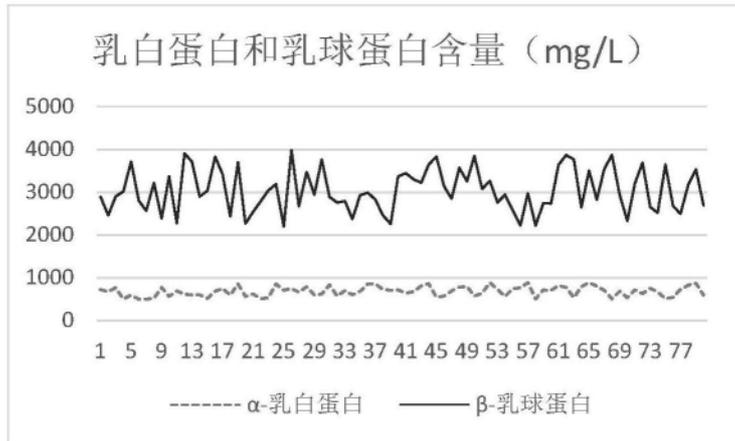


图4