



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106771146 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611165202.7

(22)申请日 2016.12.16

(71)申请人 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所

地址 100000 北京市海淀区中关村南大街12号

(72)发明人 金茂俊 王静 杜鹏飞 金芬  
余永新 邵华 郑鹭飞 王珊珊

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理事务所(普通合伙) 11371

代理人 齐云

(51)Int. Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

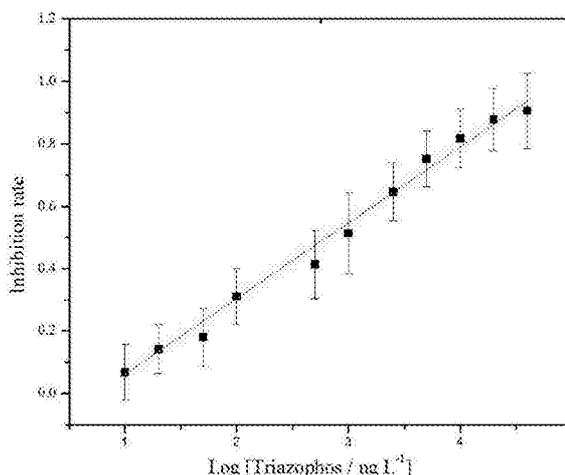
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

## (54)发明名称

三唑磷生物条形码免疫分析测定试剂盒及其应用

## (57)摘要

本发明涉及食品安全检测免疫分析技术领域,具体而言,涉及一种三唑磷生物条形码免疫分析测定试剂盒及其应用。所述试剂盒包括:三唑磷标准品、三唑磷磁性纳米探针、单标胶体金纳米探针、三唑磷双标胶体金纳米探针、酶标板、银染试剂;该试剂盒通过竞争反应体系进行检测,克服了目前生物条形码免疫分析方法采用的“三明治”结构模式基本不能适用于三唑磷的检测的缺陷。



1. 一种三唑磷生物条形码免疫分析测定试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:  
三唑磷标准品、三唑磷磁性纳米探针、单标胶体金纳米探针、三唑磷双标胶体金纳米探针、生物素探针、酶标板、银染试剂;

所述三唑磷磁性纳米探针由磁性纳米粒子和三唑磷完全抗原偶联而成;

所述单标胶体金纳米探针由单链DNA1包被胶体金颗粒得到;

所述三唑磷双标胶体金纳米探针由抗三唑磷抗体和双链DNA包被胶体金颗粒得到;

所述生物素探针由单链DNA2标记生物素得到;

所述酶标板包被有链霉亲和素;

所述双链DNA由硫醇修饰的单链DNA和条形码单链DNA互补配对而成;所述单链DNA1和单链DNA2与所述条形码单链DNA存在互补配对关系,且配对区域不重叠。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述三唑磷完全抗原由三唑磷和载体蛋白偶联而成。

3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述载体蛋白为鸡卵白蛋白。所述磁性纳米粒子的粒径为18~22nm。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述磁性纳米粒子的粒径为18~22nm。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述胶体金颗粒的粒径为13~15nm。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述三唑磷双标胶体金纳米探针具体由以下方法制备得到:

1)、取胶体金溶液调pH至8.8~9.2后向其中加入抗三唑磷抗体,搅拌混合,静置25~35min;然后加入硫醇修饰的单链DNA链,8~12℃静置36~44h;再调整pH至7.3~7.5,加入NaCl至浓度0.08~0.12mol/L,8000~11000r/min离心8~12min,弃上清,得到含寡核苷酸的胶体金;

2)、用牛血清白蛋白浓度为0.8~1.2%的磷酸盐缓冲溶液重悬所述含寡核苷酸的胶体金,孵育1~3h;再加入与所述硫醇修饰的单链DNA链互补的生物条形码DNA链,室温杂交3~5h,8000~11000r/min离心,弃上清,得到所述三唑磷双标胶体金纳米探针。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于:

在加入NaCl至既定浓度时,在120~180min内分2~4次等量加入,每次间隔40~60min。

8. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述抗三唑磷抗体为单克隆抗体。

9. 权利要求1~8任一项所述的三唑磷生物条形码免疫分析测定试剂盒在三唑磷定性定量分析中的应用。

10. 权利要求1~8任一项所述的三唑磷生物条形码免疫分析测定试剂盒测定三唑磷的方法,其特征在于,包括:

a)、将三唑磷标准品、提取与净化后的待测样品分别与等体积的三唑磷双标胶体金探针和三唑磷磁性纳米探针混合孵育;

b)、洗涤孵育产物并去杂化得到与各标准品与待测样品对应的生物条形码;

c)、将所述生物条形码与所述偶联有生物素的单链DNA2和单标纳米金探针杂交,形成“生物素探针-生物条形码-单标胶体金探针”的三明治结构,然后经生物素和链霉亲和素作用将生物条形码固定在包被链霉亲和素的酶标板上,加入银染试剂并用酶标仪测定仪测定各孔灰度值;;

d)、以三唑磷标准品的浓度为横坐标,各浓度所对应的灰度抑制率为纵坐标,建立标准曲线,并根据标准曲线计算各样品中的三唑磷浓度。

## 三唑磷生物条形码免疫分析测定试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全检测免疫分析技术领域,具体而言,涉及一种三唑磷生物条形码免疫分析测定试剂盒及其应用。

### 背景技术

[0002] 随着高毒农药品种将逐步从市场退出,三唑磷已成为替代甲胺磷农药的主要品种,广泛用于长江中下游流域水稻二化螟的防治。近年来其使用量迅速增加,在三唑磷农药在我国正进入市场旺季的同时,国外已经开始限制或禁止三唑磷农药的使用与销售。2004年11月28日,国家质检总局发布紧急预警,称欧盟于12月31日起正式禁止320种农药在欧盟销售。其中涉及中国正在生产、使用以及出口的农药达60多个品种,其中就包括了三唑磷农药。其他国家和地区对三唑磷的最大残留限量也提出了越来越严格的标准:日本规定稻米中三唑磷的最大残留限量(MRL)为不得检出;欧盟除茶叶为0.05mg/kg、棉籽0.1mg/kg外,其余样品为0.02mg/kg;我国三唑磷的最大残留限量一般都限定为0.05mg/kg。因此,加强三唑磷检测方法学研究对于保障我国食品安全和农产品贸易具有重要意义。

[0003] 免疫分析方法的作用和地位目前已得到国内外学者的广泛认可,免疫分析方法的研究也是检测方法研究最热门的领域之一。在免疫分析方法领域中,我国在酶联免疫分析方法方面开展了较为深入的研究,包括半抗原合成、抗体制备、标记物偶联、反应体系中各种理化性质对免疫分析方法的影响及半抗原结构与其所制备得到抗体之间的构效关系等方面。近年来,我国学者在荧光免疫分析、化学发光免疫分析、生物传感器和生物条形码免疫分析方法方面也开展了较多的研究工作。

[0004] 纳米金制备简单,在光学、电学、化学和催化方面有着独特的性质,纳米金还具有良好的生物相容性,在核酸、蛋白质等生物检测领域表现出潜在的应用价值。目前国内外已报道了多种基于纳米金的检测方法,主要包括基于纳米金的比色分析法、纳米金标记银染增强法、生物条形码技术、基于纳米金的荧光分析法、基于纳米金的电化学分析法等。本研究通过改变生物条形码免疫分析方法的现有反应模式,建立基于小分子竞争反应模式的生物条形码免疫分析方法并利用酶标板进行检测。通过将农药小分子半抗原与载体蛋白的偶联物包被于磁性纳米粒子表面,并于胶体金纳米探针表面结合农药抗体和起信号放大作用的生物条形码,利用磁性纳米粒子表面的包被抗原与农药分子竞争结合胶体金纳米探针表面的抗体建立竞争型免疫化学反应体系。利用磁分离系统分离免疫结合的抗原抗体复合物,采用热变性技术促使胶体金纳米探针释放生物条形码,以经银染显色的纳米金探针标记技术为基础,结合生物素亲和素系统,首次建立了一种能在酶标仪上快速检测生物条形码而间接测定农药残留的生物条形码免疫分析方法,实现对三唑磷农药的定量检测。

[0005] 有鉴于此,特提出本发明。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种三唑磷生物条形码免疫分析测定试剂盒,使用该试剂

盒可以特异地定量检测水中或食品中三唑磷含量。该试剂盒通过竞争反应体系进行检测，克服了目前生物条形码免疫分析方法采用的“三明治”结构模式基本不能适用于三唑磷的检测的缺陷。

[0007] 为了实现本发明的上述目的，特采用以下技术方案：

[0008] 一种三唑磷生物条形码免疫分析测定试剂盒，所述试剂盒包括：

[0009] 三唑磷标准品、三唑磷磁性纳米探针、单标胶体金纳米探针、三唑磷双标胶体金纳米探针、酶标板、银染试剂；

[0010] 所述三唑磷磁性纳米探针由磁性纳米粒子和三唑磷完全抗原偶联而成；

[0011] 所述单标胶体金纳米探针由单链DNA1包被胶体金颗粒得到；

[0012] 所述三唑磷双标胶体金纳米探针由抗三唑磷抗体和双链DNA包被胶体金颗粒得到；

[0013] 所述生物素探针由单链DNA2标记生物素得到；

[0014] 所述酶标板包被有链霉亲和素；

[0015] 所述双链DNA由硫醇修饰的单链DNA和条形码单链DNA互补配对而成；所述单链DNA1和单链DNA2与所述条形码单链DNA存在互补配对关系，且配对区域不重叠。

[0016] 本发明通过改变生物条形码免疫分析方法的现有反应模式，建立基于小分子竞争反应模式的生物条形码免疫分析方法。通过将三唑磷与载体蛋白的偶联物包被于磁性纳米粒子表面制备三唑磷磁性纳米探针，并于胶体金纳米探针表面结合农药抗体和起信号放大作用的生物条形码用以制备三唑磷双标胶体金纳米探针，利用磁性纳米粒子表面的包被抗原与农药分子竞争结合胶体金纳米探针表面的抗体建立竞争型免疫化学反应体系。利用磁分离系统分离免疫结合的抗原抗体复合物，采用热变性技术促使胶体金纳米探针释放生物条形码，并利用偶联有DNA探针的酶标板和单标胶体金纳米探针杂交结合生物条形码，进而利用金标银染法测定生物条形码含量，实现对三唑磷农药的定量检测。

[0017] 酶标板上的DNA2为捕获DNA，能与条形码DNA互补配对并将其捕获在芯片上；单标胶体金纳米探针上的DNA1的作用在于进一步放大条形码DNA信号。

[0018] 双标胶体金纳米探针是双链DNA包被胶体金颗粒和抗被检物的抗被检物抗体，双链DNA中的1条和胶体金颗粒通过Au—S键相连，另1条DNA链是用来指示被检物的条形码DNA。每一个胶体金颗粒上标记有很多条的条形码DNA，因而起到方法信号的作用，灵敏度较高。

[0019] 在实际操作中，条形码DNA的选择为现有技术，只要特异性和灵敏度够好即可。

[0020] 该试剂盒的使用效果具有简便、快速、灵敏、特异、稳定等优点。并且，根据本发明的检测系统为开放式操作，简便快速，特别适合广大的质检机构推广使用，为食品安全检测提供一种非常有价值的检测手段。

[0021] 优选的，如上所述的试剂盒，所述三唑磷完全抗原由三唑磷和载体蛋白偶联而成。

[0022] 鸡卵白蛋白(Ovalbumin, OVA)也称鸡卵清白蛋白，由386个氨基酸组成，分子量约43Kd。OVA作为惰性蛋白，它能维持胶体金的胶体稳定，起着有分散胶体金颗粒的骨架作用。

[0023] 惰性蛋白也可选用酪蛋白(Casein)或牛血清白蛋白(BSA)等。

[0024] 优选的，如上所述的试剂盒，所述载体蛋白为鸡卵白蛋白。所述磁性纳米粒子的粒径为18~22nm。

[0025] 优选的,如上所述的试剂盒,所述磁性纳米粒子的粒径为18~22nm。

[0026] 磁性纳米粒子的粒径对三唑磷完全抗原的偶联数量有着很大的影响,从而影响着最终反应的灵敏度。

[0027] 优选的,如上所述的试剂盒,所述胶体金颗粒的粒径为13~15nm。

[0028] 本申请的技术要点是通过形成三唑磷磁性纳米探针-三唑磷双标胶体金纳米探针的结合,与三唑磷-三唑磷双标胶体金纳米探针的结合进行竞争,并且前者的结合应该可以均一的分离。灵敏度提高的关键在于被检物的有效回收和作为每个被检物识别结合位点对应的条形码DNA链的有效释放。条形码DNA的量对应被检物的量(三唑磷磁性纳米探针对被检三唑磷的竞争性结合的抑制率),因此可以通过定量条形码DNA间接定量痕量的被检物。三唑磷磁性纳米探针-三唑磷双标胶体金纳米探针的结合实质是磁性纳米探针中的三唑磷完全抗原与双标胶体金纳米探针中的抗三唑磷抗体的结合,而二者的结合强度与抗体/抗原的量密切相关,抗体/抗原的量则与胶体金颗粒/磁性纳米粒子的粒径密切相关。

[0029] 优选的,如上所述的试剂盒,所述三唑磷双标胶体金纳米探针具体由以下方法制备得到:

[0030] 1)、取胶体金溶液调pH至8.8~9.2后向其中加入抗三唑磷抗体,搅拌混合,静置25~35min;然后加入硫醇修饰的单链DNA链,8~12℃静置36~44h;再调整pH至7.3~7.5,加入NaCl至浓度0.08~0.12mol/L,8000~11000r/min离心8~12min,弃上清,得到含寡核苷酸的胶体金;

[0031] 2)、用牛血清白蛋白浓度为0.8~1.2%的磷酸盐缓冲溶液重悬所述含寡核苷酸的胶体金,孵育1~3h;再加入与所述硫醇修饰的单链DNA链互补的生物条形码DNA链,室温杂交3~5h,8000~11000r/min离心,弃上清,得到所述三唑磷双标胶体金纳米探针。

[0032] 进一步优选的,如上所述的试剂盒:

[0033] 在加入NaCl至既定浓度时,在120~180min内分2~4次等量加入,每次间隔40~60min。

[0034] 优选的,如上所述的试剂盒,所述抗三唑磷抗体为单克隆抗体。

[0035] 单克隆抗体由于可以通过细胞株进行生产,各批次之间性质稳定,且特异性强,因而更适合试剂盒产品。

[0036] 如上所述的三唑磷生物条形码免疫分析测定试剂盒在三唑磷定性定量分析中的应用。

[0037] 如上所述的三唑磷生物条形码免疫分析测定试剂盒测定三唑磷的方法,包括:

[0038] a)、将三唑磷标准品、提取与净化后的待测样品分别与等体积的三唑磷双标胶体金探针和三唑磷磁性纳米探针混合孵育;

[0039] b)、洗涤孵育产物并去杂化得到与各标准品与待测样品对应的生物条形码;

[0040] c)、将所述生物条形码与所述偶联有生物素的单链DNA2和单标纳米金探针杂交,形成“生物素探针-生物条形码-单标胶体金探针”的三明治结构,然后经生物素和链霉亲和素作用将生物条形码固定在包被链霉亲和素的酶标板上,加入银染试剂并用酶标仪测定仪测定各孔灰度值;;

[0041] d)、以三唑磷标准品的浓度为横坐标,各浓度所对应的灰度抑制率为纵坐标,建立标准曲线,并根据标准曲线计算各样品中的三唑磷浓度。

[0042] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0043] (1) 本发明可以特异地定量检测三唑磷含量。具有简便、快速、灵敏、特异、稳定等优点。并且,根据本发明的检测系统为开放式操作,简便快速,特别适合广大的质检机构推广使用,为食品安全检测提供一种非常有价值的检测手段。

[0044] (2) 根据本发明的试剂盒,磁性纳米探针中的三唑磷半抗原与检测样品中的三唑磷竞争三唑磷双标胶体金探针上的三唑磷单抗形成直接竞争体系,因此本法采用的竞争反应体系,即确保检测的灵敏度,也可有效保证检测结果的良好重现性。另外,这种模式还便于操作和生产。

[0045] (3) 本发明的试剂盒使用的是银染方法,通过检测酶标板上的灰度值,灵敏度大大提高,可为蔬菜水果中三唑磷的检测提供更为灵敏、快速、可靠的依据。

## 附图说明

[0046] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0047] 图1为本发明实施例中以三唑磷标准品的浓度为横坐标,各浓度所对应的灰度抑制率为纵坐标,建立的标准曲线。

## 具体实施方式

[0048] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0049] 实施例1

[0050] 三唑磷生物条形码免疫分析测定试剂盒的制备方法

[0051] S11、单标胶体金探针的制备

[0052] 1)、金纳米颗粒合成方法

[0053] 向硅化好的烧杯中分别加入98mL去离子水,再分别加入2mL 50mM氯金酸原液,使氯金酸的浓度为1mM,在磁力搅拌器上1000rpm/min搅拌、250℃加热,液体沸腾后继续煮沸2min;吸取10mL 38.8mM柠檬酸三钠,迅速一次性加入烧杯中,保持搅拌速度和加热温度不变,继续煮沸6min,可发现溶液颜色由无色逐渐变成紫色,再变成酒红色,根据加入柠檬酸三钠还原剂量的不同最终变成不同的颜色,待液体冷却后用去离子水补回原体积,于4℃密闭保存,合成的金纳米颗粒的粒径控制在13~15nm。

[0054] 2)、取巯基化DNA1溶液,加入100mmol/L的三(2-羧乙基)膦溶液(TCEP),在室温下摇床上放置2小时。还原剂TCEP与DNA1之间的比例接近200:1,高比例的差距加快反应速度,提高还原效果。室温下,新合成的纳米金球在6000rcf转速下20离心分钟,将纳米金球取出溶于超纯水。取一定体积的纳米金球10000rcf离心20分钟,去掉上清液,加入0.5×Tris-硼酸(TBE)缓冲溶液,然后加入所取的巯基化DNA的量,加入氯化钠溶液至氯化钠浓度为

50mmol/L, 常温下, 反应24小时。逐渐添加氯化钠至浓度为500mmol/L (分3次加入, 每次隔1个小时加入一次), 常温下静置8小时。10000rcf离心20分钟, 除去上清液, 溶于超纯水, 重复3次, 得到巯基化DNA1修饰的纳米金球GNP溶液。

#### [0055] S12、三唑磷双标胶体金探针的制备

[0056] 取一定体积胶体金溶液, 用0.1mol/L  $K_2CO_3$ 调节至pH=9.0; 静置15min, 加入一定量的三唑磷单克隆抗体, 在搅拌下将胶体金和抗体混合, 静置30min。然后加入硫醇修饰的DNA链, 10℃静置40h, 再以磷酸缓冲液 (PBS) 调整至pH=7.4, 提高NaCl浓度, NaCl分3次加入, 每隔1个小时加入一次, 至终浓度0.1mol/L, 10000r/min离心10min, 即得到含寡核苷酸的胶体金。用1mL PBS缓冲液重悬含寡核苷酸的胶体金, 静置10~15分钟, 然后再加入5%牛血清白蛋白 (BSA), 使BSA终浓度为1%, 封闭1h。再加入与硫醇修饰的所述单链DNA链互补的生物条形码DNA链, 室温杂交4h, 10000r/min离心得到双标胶体金纳米探针。

#### [0057] S13、三唑磷磁性纳米探针的制备

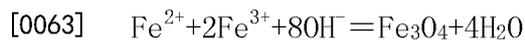
##### [0058] 1)、鸡卵白蛋白 (OVA) 标记三唑磷半抗原的制备

[0059] 辣根过氧化物酶标记三唑磷半抗原的制备, 具体方法如下:

[0060] 取半抗原0.25mmol, 溶于1mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF), 搅拌下加入60 $\mu$ l 正三丁胺和30 $\mu$ l 氯甲酸乙酯, 室温搅拌反应1h。取反应液300 $\mu$ l 缓慢滴加到6mL溶有120mg OVA的碳酸盐缓冲液 (CBS, 0.01mol/L) 中, 室温搅拌反应2h后, 装入透析袋, 先用蒸馏水透析3次, 然后用0.01mol/L的PBS透析3d, 每天换透析液3-4次。取出分装保存于-20℃的冰箱中。

##### [0061] 2)、磁性纳米粒子合成方法

[0062] 磁性微球的形成过程: 取8.1g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 和3.3g  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 加入150mL去离子水, 配成溶液, 然后移入三口烧瓶中。在 $N_2$ 保护环境下与剧烈搅拌状态下向 $Fe^{2+}$ 和 $Fe^{3+}$ 的混合溶液中18mL质量分数为25%的浓氨水, 溶液中开始生成棕褐色的 $Fe_3O_4$ 粒子, 调节溶液的pH值在9~11之间, 此刻反应温度为70℃, 在反应的过程中要保证一定的搅拌速度, 反应的离子方程式为:



[0064]  $Fe_3O_4$ /油酸的合成: 在剧烈搅拌状态下将5.0g油酸 ( $C_{18}H_{34}O_2$ ) 加入 $Fe_3O_4$ 的液体中, 然后在 $N_2$ 保护环境下, 温度为70℃水浴中反应一个小时, 使油酸均匀的包覆在粒子表面。反应结束后, 得到黑色溶胶状物质, 利用外加磁场将所得的沉淀从反应体系中分离出来, 用乙醇洗涤3次除去多余的油酸, 再用去离子水洗涤至pH=7, 此时得到油酸均匀包覆的 $Fe_3O_4$ 粒子。

[0065] 单层羧基功能化的 $Fe_3O_4$ 粒子合成: 采用高锰酸钾氧化油酸法合成壬二酸 ( $HOO(CH_2)_7COOH$ ) 形成羧基化磁性纳米粒子。加入160mL浓度为10mg/mL的 $KMnO_4$ 溶液在剧烈搅拌状态, 温度为50℃条件下反应8h, 反应结束后利用外加磁场将所得沉淀从反应介质中分离出来, 并先后用去离子水洗涤3次, 所得产物在40℃下真空干燥, 将干燥后的粒子溶于水溶液便得到稳定的羧基化磁性纳米粒子。磁性纳米粒子的粒径控制在18~22nm。

##### [0066] 3)、磁性微球和OVA-半抗原的连接

[0067] a)、微球的活化。用pH=6.0, 15mmol/L的2-(N-吗啡啉) 乙磺酸缓冲液 (MES) 作为活化缓冲溶液, 取1mL磁珠于2.0mL离心管中, 加入活化缓冲溶液后, 将上清液吸掉; 再用活化缓冲液重新洗涤磁珠2遍, 再分别加入碳二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺, 在漩涡振荡器上混合

均匀,室温活化30min。

[0068] b)、微球与OVA-半抗原偶联。用pH=7.4,0.01mol/L的磷酸盐吐温(PBST,1% Tween-20)溶液作偶联缓冲液,用活化缓冲液重新洗涤已经活化的磁珠3遍,再用偶联缓冲液洗涤磁珠2遍;然后用偶联缓冲液重悬磁珠,再加入OVA-半抗原,使得磁珠表面活化的羧基与OVA的氨基于37℃下反应1h,将OVA-半抗原偶联于磁珠表面,得到免疫磁珠。

[0069] c)、封闭。用偶联缓冲液洗涤偶联后磁珠2遍,加入含有2%BSA的偶联缓冲液封闭磁珠60min。最终得到免疫磁性探针。

[0070] S14、三唑磷标准品的制备

[0071] 用三唑磷纯品配制,浓度分别为0ng/mL、0.05ng/mL、0.01ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL,共7瓶;

[0072] 所述三唑磷纯品纯度不低于90%。

[0073] S15、反应体系工作浓度选定

[0074] 经优化选定磁性纳米探针稀释倍数为100倍,胶体金纳米探针稀释倍数为10倍。

[0075] S16、包被酶标板

[0076] 链霉亲和素用碳酸盐包被液稀释,每孔包被100μL,加入偶联有生物素的单链捕获DNA,潮湿环境下4℃过夜。洗涤2次,拍干,4℃备用。

[0077] S17、银染检测

[0078] 10μL待测DNA与20μL杂交液混匀,然后加入单标胶体金探针,均匀加入酶标板中,25℃杂交10min,洗液清1min,10μL单标纳米金探针溶液与上述混合物混匀,室温封闭30min。将该杂交产物转移到各酶标板孔,37℃保温20min,倾倒干净。加入新制银染液100μL(避光操作),室温反应10min后置于去离子水以终止反应,酶标仪检测。

[0079] S18、半成品及成品组成

[0080] 上述步骤所得部分分装即为半成品,抽出三份经过特异性、精密性、灵敏度及稳定性检定合格才能组装为三唑磷生物条形码免疫分析测定试剂盒,组装成试剂盒后还需抽检合格后才能出厂。

[0081] 综上,在本发明的研究过程中,本发明的发明人首先对所用的原材料进行了筛选试验和质量鉴定,包括抗体和三唑磷半抗原的活性,胶体金颗粒的粒径,磁性纳米颗粒的粒径和磁性等。然后通过对试剂盒的反应模式、反应时间、偶联效率、银染时间,等一系列的条件进行了优化,建立了高灵敏度及良好重现性的三唑磷生物条形码免疫分析测定方法。

[0082] 实施例2

[0083] 本发明的试剂盒使用方法

[0084] 以上实施案例1制备的三唑磷生物条形码免疫分析测定试剂盒的具体操作如下:

[0085] S21、自4℃冰箱中取出试剂盒,室温平衡10分钟;

[0086] S22、样品提取与净化

[0087] 称取10.0g(精确至0.01g)样品;加入10mL乙腈,高速匀浆0.5min,加入4.0g无水MgSO<sub>4</sub>和1.0g NaCl后高速涡旋1min,在4℃以10000r/min高速离心5min。准确移取2mL乙腈提取液于10mL塑料离心管中,加入50mg N-丙基乙二胺(PSA)和50mg C18固相分散萃取净化剂,高速涡旋0.5min后,在4℃以10000r/min高速离心5min。取1mL上清液,在30℃下氮吹至干,残渣用1mL含10%甲醇的PBS缓冲液溶解。

[0088] S23、反应孔中加入20 $\mu$ L三唑磷双标胶体金探针,然后反应孔中分别加各浓度三唑磷标准品 (0ng/mL、0.05ng/mL、0.01ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL) 和经前处理后得到的样品各20 $\mu$ L,设一个重复,然后每孔加入三唑磷磁性纳米探针20 $\mu$ L,用微量振荡器充分振荡混匀,然后置于温度为37 $^{\circ}$ C,相对湿度为70%的恒温恒湿培养箱中温育1h;

[0089] S24、用PBST液洗涤三次,去杂化得到生物条形码;

[0090] S25、酶标板加入银染试剂,室温反应10min后置于去离子水以终止反应;

[0091] S26、用酶标仪测定仪测定各孔灰度值;

[0092] S27、以三唑磷标准品的浓度为横坐标,各浓度所对应的灰度抑制率为纵坐标,建立标准曲线,并根据标准曲线计算各样品中的三唑磷浓度。

[0093] 标准曲线图见图1。

[0094] 实验例1

[0095] 本发明试剂盒的方法学检定结果

[0096] 按照本领域中常见的检定规程对实施案例1中制备的试剂盒进行鉴定,结果见表1。

[0097] 表1本发明试剂盒的方法学检定结果

检验项目	检验标准	检验结果
准确性	平均回收率在 70%-110%	90.4%
特异性	与其类似物的交叉反应率 $\leq 0.1\%$	$\leq 0.1\%$
精密性 C.V. (%)	$\leq 20\%$ (n=10)	14.7%
最低检测限	$\leq 10$ ng/mL	15.9 ng L <sup>-1</sup>
稳定性	各试剂组分置 37 $^{\circ}$ C 至少 6 天	符合以上指标

[0099] 以上结果表明“三唑磷生物条形码免疫分析测定试剂盒”的准确性、特异性、精密性、灵敏度和稳定性是完全符合条件的。

[0100] 实验例2

[0101] 三唑磷添加回收率试验

[0102] 为了检验三唑磷生物条形码免疫分析测定试剂盒的实际应用性能,将三唑磷标准溶液加入到自来水中来模拟被三唑磷污染的水样,通过标准添加回收实验来测定自来水中三唑磷的浓度,添加浓度为10ng/mL、50ng/mL和100ng/mL的三唑磷,检测结果见表2。

[0103] 表2样品中三唑磷的添加回收率

水样	添加量 (ng/mL)	回收率 均值 $\pm$ 相对标准偏差(%)	GC-MS
1	10	79.5 $\pm$ 8.42	94.5 $\pm$ 1.88
2	50	105.3 $\pm$ 7.93	95.1 $\pm$ 1.99
3	100	104.9 $\pm$ 8.53	92.7 $\pm$ 2.86

[0106] 尽管已用具体实施例来说明和描述了本发明,然而应意识到,在不背离本发明的精神和范围的情况下可以作出许多其它的更改和修改。因此,这意味着在所附权利要求中包括属于本发明范围内的所有这些变化和修改。

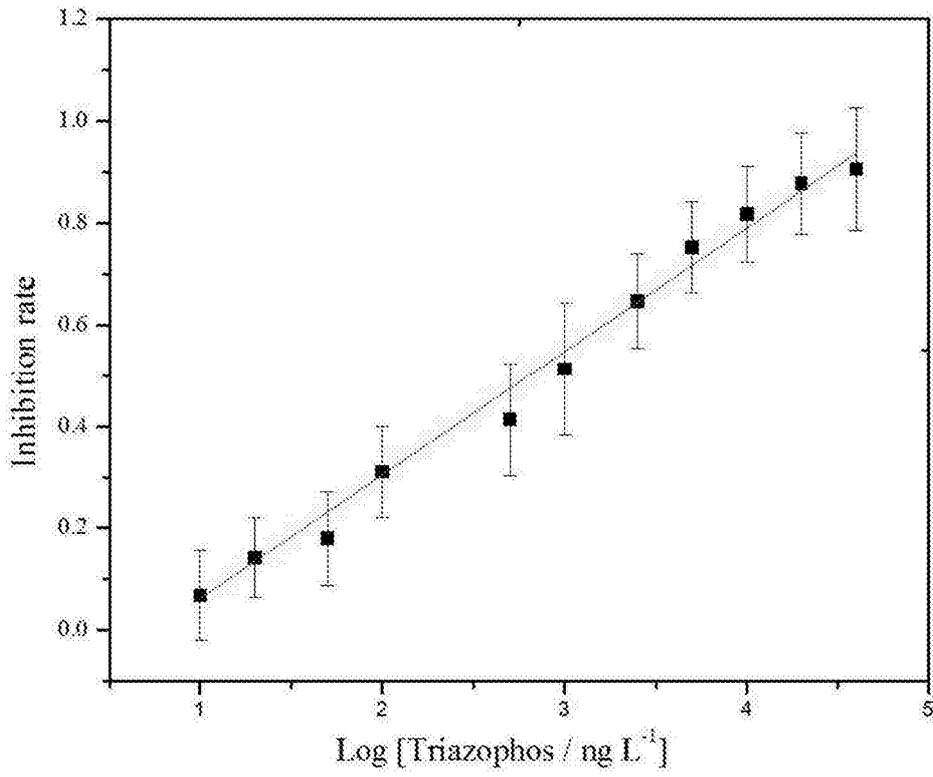


图1

专利名称(译)	三唑磷生物条形码免疫分析测定试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN106771146A</a>	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201611165202.7	申请日	2016-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
[标]发明人	金茂俊 王静 杜鹏飞 金芬 余永新 邵华 郑鹭飞 王珊珊		
发明人	金茂俊 王静 杜鹏飞 金芬 余永新 邵华 郑鹭飞 王珊珊		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/535		
代理人(译)	齐云		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及食品安全检测免疫分析技术领域，具体而言，涉及一种三唑磷生物条形码免疫分析测定试剂盒及其应用。所述试剂盒包括：三唑磷标准品、三唑磷磁性纳米探针、单标胶体金纳米探针、三唑磷双标胶体金纳米探针、酶标板、银染试剂；该试剂盒通过竞争反应体系进行检测，克服了目前生物条形码免疫分析方法采用的“三明治”结构模式基本不能适用于三唑磷的检测的缺陷。

