



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109061169 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201811104470.7

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2018.09.21

G01N 33/535(2006.01)

(71)申请人 中国烟草总公司郑州烟草研究院
地址 450001 河南省郑州市高新区枫杨街2号

申请人 国家烟草质量监督检验中心
北京勤邦生物技术有限公司

(72)发明人 范子彦 陈黎 鲁亚辉 李旭
刘惠民 唐纲岭 潘立宁 颜权平
刘二战

(74)专利代理机构 郑州中民专利代理有限公司
41110
代理人 姜振东

(51)Int.Cl.
G01N 33/58(2006.01)

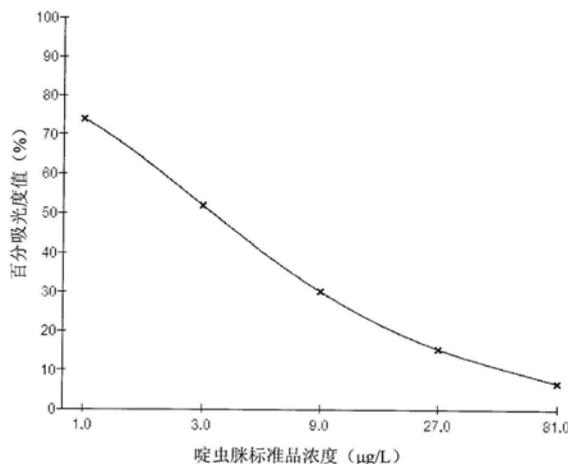
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

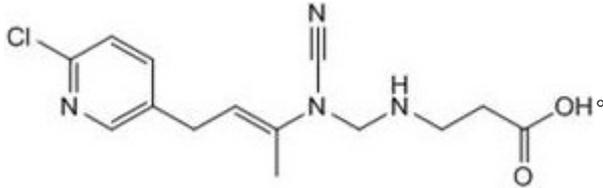
一种检测啮虫脘的酶联免疫试剂盒及其应用

(57)摘要

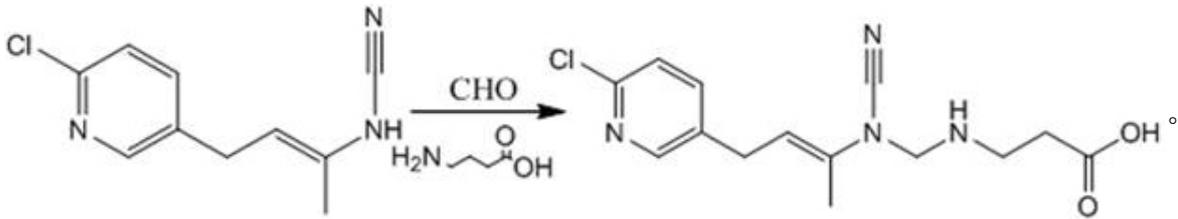
本发明提供了一种检测啮虫脘的酶联免疫试剂盒,包括:包被有啮虫脘偶联抗原的酶标板、啮虫脘特异性抗体、酶标记抗抗体、啮虫脘标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液;所述啮虫脘特异性抗体是以啮虫脘偶联抗原作为免疫原制备获得,所述啮虫脘偶联抗原是由啮虫脘半抗原与载体蛋白偶联得到,所述啮虫脘半抗原是由N-去甲啮虫脘与氨基酸反应得到。本发明还公开了一种应用上述试剂盒检测啮虫脘残留量的方法,它包括:首先进行样品前处理,然后用试剂盒进行检测,最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测烟草中啮虫脘的残留量,其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。



1. 一种检测啉虫脒的酶联免疫试剂盒,包括:包被有啉虫脒偶联抗原的酶标板、啉虫脒特异性抗体、酶标记抗抗体、啉虫脒标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液,其特征在于:所述啉虫脒特异性抗体是以啉虫脒偶联抗原作为免疫原制备获得;所述啉虫脒偶联抗原是由啉虫脒半抗原与载体蛋白偶联得到,所述啉虫脒半抗原是由N-去甲啉虫脒与氨基丁酸反应得到,其分子结构式为:



2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述啉虫脒半抗原的制备反应过程如下:



3. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白。

4. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述啉虫脒特异性抗体为啉虫脒单克隆抗体或啉虫脒多克隆抗体,其中优选啉虫脒单克隆抗体。

5. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述酶标记抗抗体中的抗抗体为羊抗鼠抗体。

6. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述酶标记抗抗体的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,其中优选辣根过氧化物酶。

7. 如权利要求1或6所述的试剂盒,其特征在于:当所述标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物显色液由底物显色液A液和底物显色液B液组成,底物显色液A液为过氧化氢或过氧化脲,底物显色液B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,所述终止液为1~2 mol/L的硫酸或盐酸溶液;当所述标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时,所述底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液,所述终止液为1~2 mol/L氢氧化钠溶液。

8. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述洗涤液优选为pH值为7.4,含有0.05%吐温-20、0.01%硫柳汞的0.02 mol/L磷酸盐缓冲液;所述复溶液优选为pH值为7.0、0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液。

9. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述啉虫脒标准品溶液的浓度分别为0 μg/L、1 μg/L、3 μg/L、9 μg/L、27 μg/L、81 μg/L。

10. 一种应用权利要求1-9任一所述试剂盒检测啉虫脒残留量的方法,其特征在于:包括以下步骤:

- (1) 样品前处理;
- (2) 用试剂盒进行检测;
- (3) 分析检测结果。

一种检测啶虫脒的酶联免疫试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术,具体涉及一种用于检测啶虫脒的酶联免疫试剂盒,其特别适于烟草及食品中啶虫脒残留量的检测。

背景技术

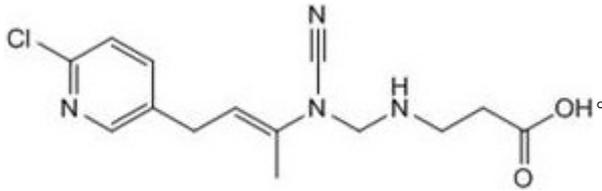
[0002] 新烟碱类农药是继有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类杀虫剂之后的一类重要杀虫剂,其主要通过选择性控制昆虫中枢神经系统烟碱型乙酰胆碱酯酶受体(nAChRs),从而阻断昆虫中枢神经系统的正常传导,导致害虫出现全身麻痹进而死亡。啶虫脒是新烟碱类杀虫剂的代表性药剂,在农业生产上被广泛用于种子、叶面和土壤中多种害虫的防治,对蚜虫、叶蝉、烟粉虱、潜叶蛾等害虫防治效果较为理想,在烟草上主要用于烟蚜的防治。农药残留控制是产品质量安全控制的重要内容,是政府机构、生产企业及消费者共同关注的重点。啶虫脒近年来使用广泛,检出率高,屡有超限情况发生。为严把质量关,GB 2763-2016《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》中规定啶虫脒在蔬菜中的最大残留限量(MRL)在0.2~1 mg/kg之间,在水果中的最大残留限量在0.5~2 mg/kg之间,在糙米、小麦、棉籽、茶叶中的最大残留限量分别为0.5、0.5、0.1和10 mg/kg,我国尚未制定烟草中啶虫脒的最大残留限量,国际烟草科学研究合作中心(CORESTA)规定烟草中啶虫脒的指导性残留限量为3 mg/kg。因此,为避免啶虫脒残留对人体造成危害以及突破国际贸易壁垒,建立简单、快速、准确、可靠的啶虫脒残留量的检测方法很有必要。

[0003] 目前,有关啶虫脒残留分析的研究主要集中于气相色谱、液相色谱及气相色谱-质谱联用技术、液相色谱-质谱联用技术。仪器分析方法虽可以实现准确定性定量,但需要复杂昂贵的仪器设备及专业操作人员,加之样品前处理繁琐费时、检测时间长、检测费用高,对于现场检测工作的开展具有局限性。因此,能否提供一种用酶联免疫法测定烟草等样品中啶虫脒残留量的试剂盒,正是本发明的研究重点。

发明内容

[0004] 本发明的目的正是基于上述现有技术状况,提供一种结构简单、使用方便、价格便宜、便于携带的用于啶虫脒残留量检测的酶联免疫试剂盒,并提供一种高效、准确、简便、适于大批量样本筛选的定性、定量检测方法。

[0005] 本发明试剂盒,包括:包被有啶虫脒偶联抗原的酶标板、啶虫脒特异性抗体、酶标记抗体、啶虫脒标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液;所述啶虫脒特异性抗体是以啶虫脒偶联抗原作为免疫原制备获得;所述啶虫脒偶联抗原是由啶虫脒半抗原与载体蛋白偶联得到,所述啶虫脒半抗原是由N-去甲啶虫脒与氨基丁酸反应得到,其分子结构式为:



[0006] 所述啉虫脒半抗原的具体制备方法包括以下步骤：

取N-去甲啉虫脒0.50 g，加甲醇50 mL溶解，加氨基丁酸0.30 g，搅拌，加37%甲醛水溶液0.37 mL，搅拌，混匀，80℃反应4 h；停止反应，旋蒸除去甲醇，加水50 mL，加100 mL乙酸乙酯萃取，萃取三次，合并有机相，旋蒸蒸干，上硅胶柱，二氯甲烷/甲醇(V/V, 10/1)洗脱分离，得到半抗原产物羧基啉虫脒0.69 g。

[0007] 所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白。

[0008] 所述啉虫脒特异性抗体为啉虫脒单克隆抗体或啉虫脒多克隆抗体，其中优选啉虫脒单克隆抗体。

[0009] 所述酶标记抗抗体中的抗抗体为羊抗鼠抗抗体。

[0010] 所述酶标记抗抗体的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶，其中优选辣根过氧化物酶；酶标记的抗抗体是采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶与抗抗体进行偶联得到的。

[0011] 为了方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还包括啉虫脒标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液。

[0012] 所述啉虫脒标准品溶液6瓶，浓度分别为0 μg/L、1 μg/L、3 μg/L、9 μg/L、27 μg/L、81 μg/L。

[0013] 当标记酶为辣根过氧化物酶时，所述底物显色液由底物显色液A液和底物显色液B液组成，底物显色液A液为过氧化氢或过氧化脲，底物显色液B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺，所述终止液为1~2 mol/L的硫酸或盐酸溶液；当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时，所述底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液，所述终止液为1~2 mol/L氢氧化钠溶液。

[0014] 所述洗涤液优选为pH值为7.4，含有0.05%吐温-20、0.01%硫柳汞的0.02 mol/L磷酸盐缓冲液。所涉百分比均为质量体积百分比，单位g/ml。

[0015] 所述复溶液优选为pH值为7.0、0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0016] 本发明中酶标板的制备过程为：用包被缓冲液将包被原稀释成20 μg/mL，每孔加入100 μL，37℃避光孵育2 h或4℃过夜，倾去孔中液体，用洗涤液洗涤2次，每次30 s，拍干，然后在每孔中加入150~200 μL封闭液，37℃避光孵育1~2 h，倾去孔内液体拍干，干燥后用铝膜真空密封保存。

[0017] 其中，在酶标板制备过程中所用到的包被缓冲液优选为pH值为9.6的0.05 mol/L碳酸盐缓冲液，封闭液优选为pH值为7.4，含有1%~3%(g/ml)酪蛋白、0.1~0.3 mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0018] 本发明的检测原理为：

在微孔条上预包被啉虫脒偶联抗原，加入样本溶液或标准品溶液后，再加入啉虫脒特异性抗体溶液，样本中的啉虫脒与酶标板上包被的啉虫脒偶联抗原竞争啉虫脒特异性抗体，加入酶标记抗抗体进行放大作用，用底物显色液显色，样本吸光度值与啉虫脒的残留量呈负相关，与标准曲线比较即可得到样本中啉虫脒的残留量；同时根据酶标板上颜色的深

浅,与系列浓度的标准品溶液颜色的比较可粗略判断样本中啉虫脒残留量的浓度范围。

[0019] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测啉虫脒残留量的方法,它包括步骤:

- (1) 样本前处理;
- (2) 用试剂盒进行检测;
- (3) 分析检测结果。

[0020] 本发明检测啉虫脒的酶联免疫试剂盒主要采用间接竞争ELISA方法定性或定量检测样本中啉虫脒的残留量;对样本的前处理要求低,样本前处理过程简单,能同时快速检测大批量样本;主要试剂以工作液的形式提供,检验方法方便易行,检测速度快、检测成本低,非常容易推广。本发明的半抗原具有适当末端活性基团,修饰位点及间隔臂长度选择合适,且能最大程度模拟啉虫脒的分子结构,以此半抗原为基础开发的试剂盒具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。本发明的酶联免疫试剂盒,结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利、检测方法高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量。

附图说明

[0021] 图1:啉虫脒半抗原合成路线图,

图2:试剂盒标准曲线图(该图在摘要附图)。

具体实施方式

[0022] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。另外,本领域的技术人员在所附权利要求书限定的范围内可能会对本发明进行各种改动或修饰,这些改动或修饰同样应落入本发明的保护范围。

[0023] 实施例1 检测啉虫脒的酶联免疫试剂盒的制备

1、啉虫脒半抗原的合成及鉴定

取N-去甲啉虫脒0.50 g,加甲醇50 mL溶解,加氨基丁酸0.30 g,搅拌,加37%甲醛水溶液0.37 mL,搅拌,混匀,80℃反应4 h;停止反应,旋蒸除去甲醇,加水50 mL,加100 mL乙酸乙酯萃取,萃取三次,合并有机相,旋蒸蒸干,上硅胶柱,二氯甲烷/甲醇(V/V,10/1)洗脱分离,得到半抗原产物羧基啉虫脒0.69 g,收率92.81%。

[0024] 取上述半抗原经核磁共振氢谱鉴定,¹H NMR(CDC1₃, 300MHZ) δ:11.0 (1H, -COOH), 8.53 (1H, s, ArH), 7.86 (1H, d, ArH), 7.21 (1H, d, ArH), 4.16 (1H, dd, =CH-), 3.91 (1H, s, -CH₂-), 3.21 (2H, d, -CH₂-), 2.82 (2H, t, -CH₂-), 2.49 (2H, t, -CH₂-), 2.26 (3H, s, -CH₃), 2.0 (1H, s, -NH-)。化学位移δ=11的为间隔臂上羧基氢的共振吸收峰,δ=2.82, 2.49为间隔臂上亚甲基氢的共振吸收峰,这些峰的存在,证明间隔臂偶联成功。

[0025] 2、啉虫脒偶联抗原的合成及鉴定

免疫原制备——啉虫脒半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

[0026] 取半抗原羧基啉虫脒11 mg,加二甲基亚砜1 mL溶解,加氯甲酸异丁酯0.18 mL,三乙胺0.1 mL,0~4℃反应1 h,得到半抗原活化液A液;取BSA 50 mg,加0.8%盐水3 mL溶解,得到B液;将A液滴加到B液中,继续搅拌反应5 h,0.02 mol/L PB透析纯化3天,每天换液3次,

得到免疫原,分装,-20℃保存。

[0027] 包被原制备——啮虫脘半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0028] 取半抗原羧基啮虫脘5 mg,加二甲基亚砜1 mL溶解,加二环己基碳二亚胺(DCC)9 mg,N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)6 mg,室温反应1 h,得到半抗原活化液A液;取OVA 50 mg,加0.8%盐水3 mL溶解,得到B液;将A液滴加到B液中,继续搅拌反应5 h,0.02 mol/L PB透析纯化3天,每天换液3次,得到包被原,分装,-20℃保存。

[0029] 按合成啮虫脘偶联抗原反应所用半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例,进行紫外(200 nm ~ 400 nm)扫描测定,通过比较三者分别在260 nm和280 nm的吸光值计算其结合比。偶联物啮虫脘半抗原-载体蛋白的最大吸收峰与啮虫脘半抗原、载体蛋白的最大吸收峰相比发生了明显的变化,表明啮虫脘半抗原-载体蛋白的合成是成功的。经计算,半抗原与BSA的结合比为14:1,与OVA的结合比为9:1。

[0030] 3、啮虫脘单克隆抗体的制备

(1) 杂交瘤细胞的获得

1) 首次免疫:将啮虫脘半抗原-BSA偶联物(免疫原)与等量的弗氏完全佐剂充分乳化,皮下注射6周龄的Balb/c小鼠,每只0.2 mL;

2) 加强免疫两次:从首次免疫开始,每两周加强免疫一次,用弗式不完全佐剂代替弗氏完全佐剂,方法和剂量同首次免疫;

3) 最后一次加强免疫一周后眼底静脉采血测效价和抑制,有抑制且效价达到1:10000以上时进行如下末次免疫:腹腔注射不加任何佐剂的免疫原溶液0.1 mL,三天后处死小鼠,取其脾脏与骨髓瘤细胞融合;

4) 采用间接竞争酶联免疫分析方法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,得到并建立稳定分泌啮虫脘单克隆抗体的杂交瘤细胞株,取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。

[0031] (2) 单克隆抗体的制备

1) 细胞复苏:取出啮虫脘单克隆抗体杂交瘤细胞株冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养;

2) 制备腹水与抗体纯化:采用体内诱生法,将Balb/c小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油0.5 mL/只,7天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^5 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化,得到啮虫脘单克隆抗体溶液(-20℃保存)。

[0032] (3) 单克隆抗体效价的测定

用间接竞争 ELISA法测定抗体的效价为1:(100000~300000)。

[0033] 间接竞争ELISA方法:用啮虫脘半抗原-OVA偶联物包被酶标板,加入啮虫脘标准品溶液、啮虫脘单克隆抗体溶液和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体溶液,25℃反应30 min,倒出孔内液体,用洗涤液洗涤3~5次,用吸水纸拍干;加入底物显色液,25℃反应15 min后,加入终止液终止反应;设定酶标仪于波长450 nm处测定每孔吸光度值。

[0034] (4) 单克隆抗体特异性的测定

抗体特异性是指它同特异性抗原结合的能力与同该类抗原类似物结合能力的比较,常用交叉反应率作为评价标准。交叉反应越小,抗体的特异性则越高。

[0035] 本实验将烟碱类杀虫剂(啮虫脘、吡虫啉、烯啶虫胺、噻虫啉、噻虫嗪、噻虫胺、呋虫

胺)做系列稀释,分别与单克隆抗体进行间接竞争ELISA,制作标准曲线,分析得到IC₅₀,然后按下式计算交叉反应率:

交叉反应率 (%) =	引起 50%抑制的啶虫脒浓度	×100%
	引起 50%抑制的其他烟碱类杀虫剂浓度	

结果显示各类似物的交叉反应率为:啶虫脒100%、吡虫啉<1%、烯啶虫胺<1%、噻虫啉<1%、噻虫嗪<1%、噻虫胺<1%、呋虫胺<1%。本发明抗体对吡虫啉、烯啶虫胺、噻虫啉、噻虫嗪、噻虫胺、呋虫胺等其他烟碱类杀虫剂无交叉反应,只针对啶虫脒有特异性结合。

[0036] 4、羊抗鼠抗抗体的制备

以羊为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原免疫无病原体羊,得到羊抗鼠抗抗体。

[0037] 5、酶标记抗抗体的制备

将羊抗鼠抗抗体与辣根过氧化物酶(HRP)采用改良后的过碘酸钠法进行偶联。传统的过碘酸钠法要求反应体系中酶与抗体的摩尔浓度比为4:1,由于辣根过氧化物酶在强氧化作用下产生许多与抗体结合的位点,这样活化的辣根过氧化物酶分子充当了连接各分子的桥梁,降低了酶标记物的酶活性,使制备的偶联物中混有许多聚合体。为了解决这个问题,我们将传统的方法进行了改良,即:

(1)省去了氨基的封闭过程,因为能产生自身氨基连接的氨基实际很少;

(2)降低辣根过氧化物酶与抗体的摩尔浓度比率至2:1,改良后的方法比传统的方法简便,对酶活性的损失减少。

[0038] 6、酶标板的制备

用包被缓冲液将包被原(啶虫脒半抗原-OVA偶联物)稀释成20 μg/mL,每孔加入100 μL,37℃避光孵育2 h,倾去孔中液体,用洗涤液洗涤2次,每次30 s,拍干,然后在每孔中加入200 μL封闭液,37℃避光孵育2 h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0039] 包被缓冲液优选为pH值为9.6的0.05 mol/L碳酸盐缓冲液,封闭液优选为pH值为7.4,含有1%~3%酪蛋白、0.1~0.3 mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0040] 实施例2 检测啶虫脒的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测啶虫脒的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

(1)包被有啶虫脒偶联抗原的酶标板;

(2)啶虫脒标准品溶液,浓度分别为0 μg/L、1 μg/L、3 μg/L、9 μg/L、27 μg/L、81 μg/L;

(3)啶虫脒特异性抗体;

(4)用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;

(5)底物显色液由底物显色液A液和底物显色液B液组成,底物显色液A液为过氧化脲,底物显色液B液为四甲基联苯胺;

(6)终止液为2 mol/L的硫酸溶液;

(7)洗涤液为pH值为7.4,含有0.05%吐温-20、0.01%硫柳汞的0.02 mol/L磷酸盐缓冲液;

(8)复溶液为pH值为7.0、0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0041] 实施例3 烟叶样本中啶虫脒残留量的检测

1、样本前处理

称取 $1.0\text{g} \pm 0.05\text{ g}$ 样本至50 mL聚苯乙烯离心管中,加入5 mL甲醇,用匀浆机将其充分打碎;3000 rpm室温(20~25℃)离心5 min;移取25 μL 上清至2 mL洁净干燥聚苯乙烯离心管中,加入475 μL 复溶液,用涡旋仪涡动混匀,取50 μL 用于分析。

[0042] 2、用试剂盒检测

将啉虫脒特异性抗体与辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体以1:10的体积比混合;向包被有啉虫脒偶联抗原的酶标板微孔中加入啉虫脒标准品溶液或经前处理的样本溶液50 μL /孔,然后加入啉虫脒特异性抗体与辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体的混合液50 μL /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30 min;倒出孔内液体,每孔加入250 μL 洗涤液充分洗涤4~5次,每次间隔10 s,用吸水纸拍干;每孔加入底物显色液A液过氧化脲50 μL ,底物显色液B液四甲基联苯胺50 μL ,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中显色15 min,每孔加入终止液2 mol/L硫酸50 μL ,轻轻振荡混匀,用酶标仪波长设定在450 nm处,测定每孔吸光度值(OD值)。

[0043] 3、检测结果分析

用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准品溶液(0标准)的吸光度值(B_0)再乘以100%,得到百分吸光度值。以啉虫脒标准品浓度($\mu\text{g}/\text{L}$)的对数值为X轴,百分吸光度值为Y轴,绘制标准曲线,如图2所示。用同样的办法计算样本溶液的百分吸光度值,相对应每一个样本的啉虫脒残留量则可从标准曲线上读出。

[0044] 实施例4 啉虫脒酶联免疫试剂盒技术参数的确定试验

1、试剂盒灵敏度和检测限

按照常规方法测定试剂盒灵敏度,试剂盒标准曲线最低点为1 $\mu\text{g}/\text{L}$,标准曲线的范围为1~81 $\mu\text{g}/\text{L}$, IC_{50} (50%抑制浓度)浮动范围为2.8~4.1 $\mu\text{g}/\text{L}$;对空白烟叶样本20份进行检测,从标准曲线上查出对应于各百分吸光度值的浓度,以20份样本浓度的平均值加上3倍标准差表示检测限,结果得该方法对烟叶样本的检测限为0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

[0045] 2、样本精密度和准确度试验

以回收率作为准确度评价指标,以重复测定某一浓度样本的检测结果相对标准偏差(RSD%)作为精密度评价指标。计算公式为:回收率(%) = 实际测定值/理论值 \times 100%,其中理论值为样本的添加浓度;相对标准偏差RSD% = $\text{SD}/\bar{X} \times 100\%$,其中SD为标准偏差, \bar{X} 为测定数据的平均值。

[0046] 按0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、0.4 $\mu\text{g}/\text{g}$ 三个浓度啉虫脒对空白烟叶样本进行添加回收测定,每个样本做4个平行,用三批不同试剂盒进行测定,计算样本的平均回收率及精密度,结果见下表。

[0047] 表1 精密度及准确度试验

样本	添加浓度($\mu\text{g/g}$)	回收率 ($n=4$)%	批内RSD($n=4$)%	批间RSD($n=3$)%
烟叶	0.1	85.7	7.4	12.0
	0.2	103.1	5.9	8.3
	0.4	98.2	8.1	10.6

以0.1、0.2、0.4 $\mu\text{g/g}$ 三个浓度的啮虫脒对空白烟叶样本进行添加,平均回收率在70%~110%之间;批内、批间相对标准偏差均小于15%。

[0048] 3、试剂盒稳定性试验

试剂盒保存条件为2~8 $^{\circ}\text{C}$,经过12个月的测定,试剂盒的最大吸光度值(零标准)、50%抑制浓度、啮虫脒添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在37 $^{\circ}\text{C}$ 保存条件下放置7天,进行加速老化实验,结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻7天,测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在2~8 $^{\circ}\text{C}$ 至少保存12个月以上。

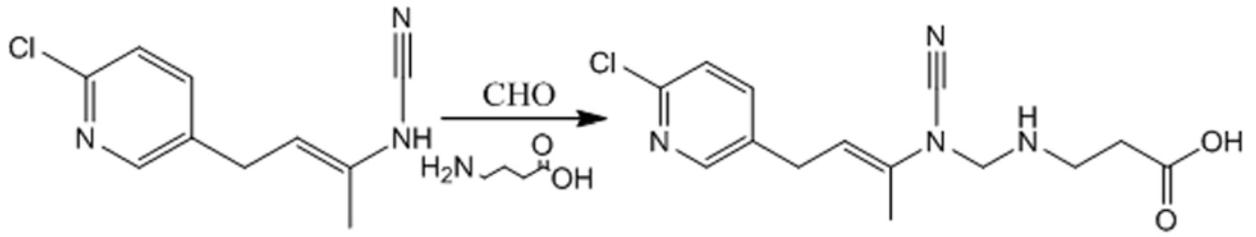


图1

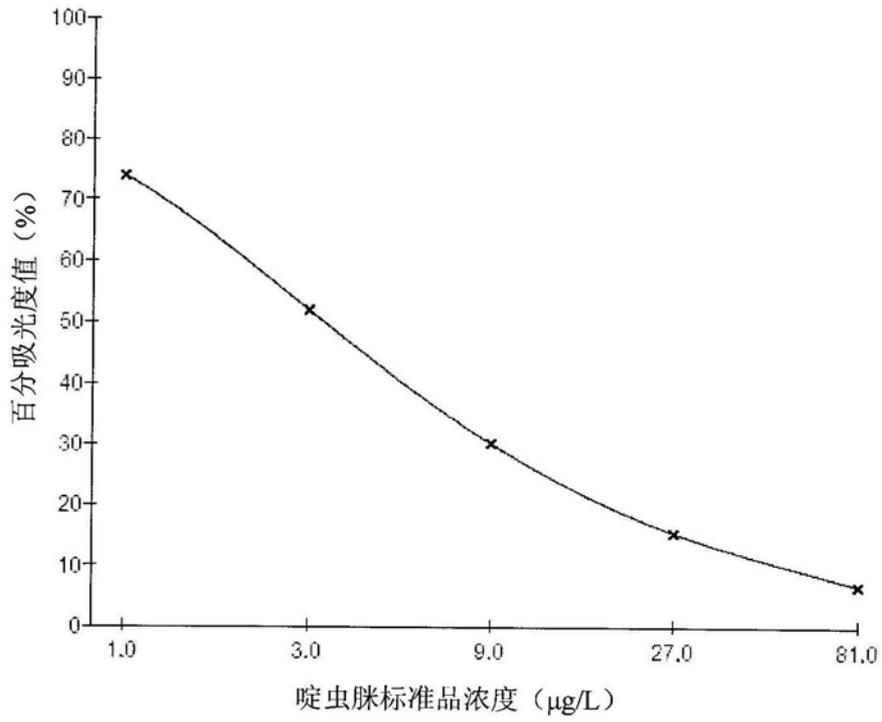


图2

专利名称(译)	一种检测啮虫脘的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN109061169A	公开(公告)日	2018-12-21
申请号	CN201811104470.7	申请日	2018-09-21
[标]申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院 国家烟草质量监督检验中心 北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院 国家烟草质量监督检验中心 北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院 国家烟草质量监督检验中心 北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	范子彦 陈黎 鲁亚辉 李旭 刘惠民 唐纲岭 潘立宁 颜权平 刘二战		
发明人	范子彦 陈黎 鲁亚辉 李旭 刘惠民 唐纲岭 潘立宁 颜权平 刘二战		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/581 G01N33/535 G01N33/543		
代理人(译)	姜振东		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测啮虫脘的酶联免疫试剂盒，包括：包被有啮虫脘偶联抗原的酶标板、啮虫脘特异性抗体、酶标记抗体、啮虫脘标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液；所述啮虫脘特异性抗体是以啮虫脘偶联抗原作为免疫原制备获得，所述啮虫脘偶联抗原是由啮虫脘半抗原与载体蛋白偶联得到，所述啮虫脘半抗原是由N-去甲啮虫脘与氨基丁酸反应得到。本发明还公开了一种应用上述试剂盒检测啮虫脘残留量的方法，它包括：首先进行样品前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测烟草中啮虫脘的残留量，其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。

