



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109061170 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201811104508.0

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 陈黎 范子彦 吴小胜 鲁亚辉
刘惠民 唐纲岭 颜权平 潘立宁
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2页 说明书7页 附图2页

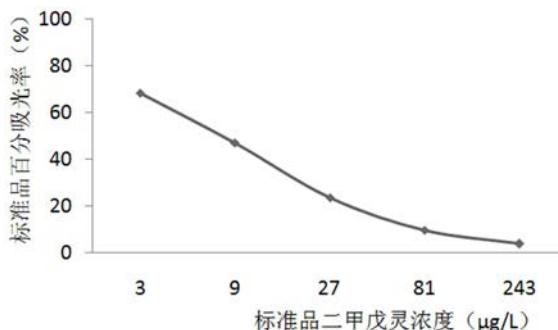
(54)发明名称

一种检测二甲戊灵的酶联免疫试剂盒及其
应用

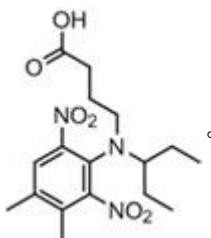
(57)摘要

一种检测二甲戊灵的酶联免疫试剂盒及其
应用,它包括:包被有包被原的酶标板、二甲戊灵
特异性抗体、酶标记物、二甲戊灵标准品溶液、底
物显色液、终止液、洗涤液、复溶液;所述包被原
为二甲戊灵偶联抗原,所述二甲戊灵特异性抗体
是以二甲戊灵偶联抗原作为免疫原制备获得,所
述二甲戊灵半抗原是由N-(1-乙基丙基)-3,4-二
甲基苯胺与4-溴丁酸乙酯反应生成羟基化N-(1-
乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,再与浓硝酸反应生
成硝基羟化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,
再与氢氧化钾反应得到。本发明提供的酶联免疫
试剂盒可用于检测烟叶中二甲戊灵的残留量,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。

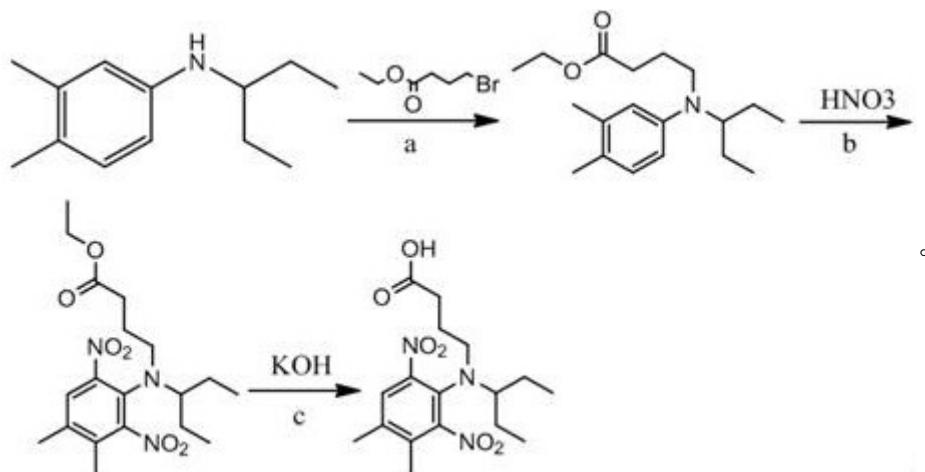
A
CN 109061170



1. 一种检测二甲戊灵的酶联免疫试剂盒,其特征在于:包括包被有包被原的酶标板、二甲戊灵特异性抗体、酶标记物、二甲戊灵标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液;所述酶标记物为酶标记抗抗体,所述包被原为二甲戊灵偶联抗原,所述二甲戊灵特异性抗体是以二甲戊灵偶联抗原作为免疫原制备获得,所述二甲戊灵偶联抗原是由二甲戊灵半抗原与载体蛋白偶联得到,所述二甲戊灵半抗原是由N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺与4-溴丁酸乙酯反应生成羟基化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,再与浓硝酸反应生成硝基羟化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,再与氢氧化钾反应得到,其分子结构式为:



2. 如权利要求1所述的二甲戊灵酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述二甲戊灵半抗原的制备反应过程如下:



3. 如权利要求1所述的二甲戊灵酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述载体蛋白为牛血清白蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白。

4. 如权利要求1所述的二甲戊灵酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述二甲戊灵特异性抗体为二甲戊灵单克隆抗体。

5. 如权利要求1所述的二甲戊灵酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述二甲戊灵标准品溶液6瓶,浓度分别为0 μg/L、3 μg/L、9 μg/L、27 μg/L、81 μg/L、243 μg/L。

6. 如权利要求1所述的二甲戊灵酶联免疫试剂盒,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;所述酶标记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。

7. 如权利要求1所述的二甲戊灵酶联免疫试剂盒,其特征在于:当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物显色液由底物液A液和底物液B液组成,A液为过氧化氢或过氧化脲,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。

8. 如权利要求1所述的二甲戊灵酶联免疫试剂盒,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‰硫柳汞防腐剂的0.02 mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为质量体积百分比。

9. 如权利要求1所述的二甲戊灵酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述复溶液优选为pH值为7.0、0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液。

10. 一种应用权利要求1-9任一项所述酶联免疫试剂盒检测烟叶样本中二甲戊灵残留的方法,其特征在于:包括以下步骤:

- 1) 将待测烟叶样本进行前处理,得到待测烟叶样本溶液;
- 2) 用所述试剂盒进行检测;
- 3) 分析检测结果。

一种检测二甲戊灵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二甲戊灵的酶联免疫试剂盒,其特别适于烟叶中二甲戊灵残留量的检测。

背景技术

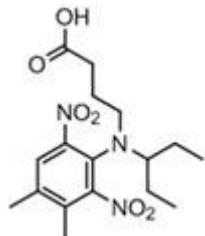
[0002] 二甲戊灵 (Pendimethalin) 属于二硝基苯胺类除草剂,其作用机制为抑制分生组织细胞分裂。双子叶植物吸收二甲戊灵的部位为下胚轴,单子叶植物吸收部位为幼芽。二甲戊灵适用于玉米、大豆、小麦、花生、棉花等多种旱地作物防除马唐、狗尾草、马齿苋等一年生禾本科和阔叶杂草。烟草上主要用于化学抑芽和烟草杂草防除。依据中国农药急性毒性分级标准,二甲戊灵被划分为一种低毒的化合物。依据美国环保局EPA的毒物分类标准,二甲戊灵属于III类,低毒化合物,安全摄入量为每天0.13 mg/kg。根据我国2016年发布的国家标准《GB2763-2016食品中农药最大残留限量》的规定,稻谷、韭菜、结球甘蓝、普通白菜、菠菜、芹菜、大白菜中二甲戊灵的最大残留限量为0.2 mg/kg,糙米、玉米、棉籽、大蒜、莴苣中二甲戊灵的最大残留限量为0.1 mg/kg。国际烟草科学合作中心(CORESTA)规定烟草中二甲戊灵的指导性残留限量为5 mg/kg。

[0003] 目前二甲戊灵的检测方法主要是仪器检测方法,如气相色谱法、气相色谱-质谱法、气相色谱串联质谱法、高效液相色谱法、液相色谱串联质谱法,等。但是由于这些分析方法仪器设备昂贵,技术水平要求较高,样品还需要进行纯化处理,不利于现场筛查。提供一种利用酶联免疫法测定烟叶中二甲戊灵残留量的试剂盒,正是本发明的研究重点。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种二甲戊灵酶联免疫试剂盒及其应用。

[0005] 本发明试剂盒,它包括:包被有包被原的酶标板、二甲戊灵特异性抗体、酶标记物、二甲戊灵标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液;所述酶标记物为酶标记抗抗体,所述包被原为二甲戊灵偶联抗原,所述二甲戊灵特异性抗体是以二甲戊灵偶联抗原作为免疫原制备获得,所述二甲戊灵偶联抗原是由二甲戊灵半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白,所述二甲戊灵半抗原是由N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺与4-溴丁酸乙酯反应生成烃基化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,再与浓硝酸反应生成硝基烃化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,再与氢氧化钾反应得到,其分子结构式为:



所述二甲戊灵半抗原的具体制备方法如下:

1) 取1.00 g N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,加80 mL丙酮溶解,加0.35 g 氢氧化钾,加1.21 g 4-溴丁酸乙酯,加热回流反应3 h,TLC检测,原料全部反应完成,停止反应,冷却到室温,旋蒸,除去丙酮,加60 mL水,加50 mL二氯甲烷萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,蒸干浓缩,上硅胶柱,使用体积比为10:1的石油醚/乙酸乙酯洗脱分离,得到中间体烃基化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺1.51 g,收率94.97%;

2) 取1.50 g 中间体烃基化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,加5 mL浓硫酸溶解澄清,在冰浴下缓慢滴加浓硝酸3 mL,恢复至室温,继续搅拌4 h,停止反应,冰浴下加蒸馏水30 mL,加氢氧化钠溶液调节pH值到7,加50 mL乙酸乙酯萃取,无水硫酸钠干燥蒸干,得到红色油状物,使用体积比为1:5的二氯甲烷/正己烷重结晶,得到硝基烃化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺1.81 g,收率93.30%;

3) 取1.80 g 硝基烃化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺加2 mol/L氢氧化钾水溶液,60 °C搅拌3 h,TLC检测,原料无剩余,停止反应,冷却到室温,加稀盐酸,调节pH值到6,加80 mL乙酸乙酯萃取,有机相水洗,无水硫酸钠干燥,蒸干,使用体积比为1:1的乙醚/正己烷重结晶,得到二甲戊灵半抗原产物1.60 g,收率95.81%。

[0006] 所述二甲戊灵特异性抗体为二甲戊灵单克隆抗体。

[0007] 所述酶标记抗抗体中的抗抗体为羊抗鼠抗抗体。

[0008] 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。

[0009] 所述二甲戊灵标准品溶液6瓶,浓度分别为0 μg/L、3 μg/L、9 μg/L、27 μg/L、81 μg/L、243 μg/L。

[0010] 当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物显色液由底物液A液和底物液B液组成,A液为过氧化氢或过氧化脲,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。

[0011] 所述洗涤液优选为pH值为7.4,含有0.05%吐温-20、0.01%硫柳汞防腐剂的0.02 mol/L磷酸盐缓冲液,其中的百分比为质量体积百分比,单位g/mL。

[0012] 所述复溶液优选为pH值为7.0、0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0013] 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°C避光孵育2 h或4°C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°C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。

[0014] 其中,在酶标板制备过程中所用到的包被缓冲液为pH值为9.6的0.05 mol/L碳酸盐缓冲液,封闭液为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。

[0015] 本发明的检测原理为:

在微孔条上预包被二甲戊灵偶联抗原,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入二甲戊灵单克隆抗体溶液,样本中的二甲戊灵与酶标板上包被的二甲戊灵偶联抗原竞争二甲戊灵单克隆抗体,加入酶标记抗抗体进行放大作用,用显色液显色,样本吸光度值与二甲戊灵的

残留量呈负相关,与标准曲线比较即可得到样本中二甲戊灵的残留量;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二甲戊灵残留量的浓度范围。

[0016] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测二甲戊灵残留量的方法,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。

[0017] 本发明检测二甲戊灵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二甲戊灵的残留量;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;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,且能最大程度模拟二甲戊灵的分子结构,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。

[0018] 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、适于大批量样本筛选的定性、定量检测。

附图说明

[0019] 图1:二甲戊灵半抗原合成路线图,
图2:二甲戊灵半抗原核磁共振氢谱图,
图3:试剂盒标准曲线图(该图作为摘要附图)。

具体实施方式

[0020] 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。

[0021] 实施例1 试剂盒组分的制备

1、二甲戊灵半抗原的合成(合成路线见附图1)及鉴定

取1.00 g N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,加80 mL丙酮溶解,加0.35 g 氢氧化钾,加1.21 g 4-溴丁酸乙酯,加热回流反应3 h, TLC检测,原料全部反应完成,停止反应,冷却到室温,旋蒸,除去丙酮,加60 mL水,加50 mL二氯甲烷萃取,有机相无水硫酸钠干燥,蒸干浓缩,上硅胶柱,使用体积比为10:1的石油醚/乙酸乙酯洗脱分离,得到中间体烃基化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺1.51 g,收率94.97%;

取1.50 g 中间体烃基化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,加5 mL浓硫酸溶解澄清,在冰浴下缓慢滴加浓硝酸3 mL,恢复至室温,继续搅拌4 h,停止反应,冰浴下加蒸馏水30 mL,加氢氧化钠溶液调节pH值到7,加50 mL乙酸乙酯萃取,无水硫酸钠干燥蒸干,得到红色油状物,使用体积比为1:5的二氯甲烷/正己烷重结晶,得到硝基烃化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺1.81 g,收率93.30%;

取1.80 g 硝基烃化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺加2 mol/L氢氧化钾水溶液,60℃搅拌3 h,TLC检测,原料无剩余,停止反应,冷却到室温,加稀盐酸,调节pH值到6,加80 mL乙酸乙酯萃取,有机相水洗,无水硫酸钠干燥,蒸干,使用体积比为1:1的乙醚/正己烷重结晶,

得到二甲戊灵半抗原产物1.60 g,收率95.81%。

[0022] 核磁鉴定¹H NMR(CDCl₃,300MHZ)δ: 11.00 (1H, s), 2.398 (6H, s), 2.61 (1H, t), 3.655 (2H, s, J=7.500), 8.213 (14, 1H), 1.419 (4H, qd, J=7.126, J=7.017), 1.923 (2H, tt, J=7.500, J=7.367), 0.829 (6H, t, J=7.126)。化学位移δ=11.0的为间隔臂羧基氢共振吸收峰,δ=3.655、1.923、2.398的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。

[0023] 2、二甲戊灵偶联抗原的合成及鉴定

免疫原制备——二甲戊灵半抗原与人血清白蛋白(HSA)偶联得到免疫原。

[0024] 取二甲戊灵半抗原10 mg,加二甲基亚砜(DMSO)溶解,加碳二亚胺(EDC)5.7 mg,搅拌,澄清,加N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)3.8 mg,室温搅拌活化3 h,得到A液;取HAS 50 mg,加8 mL 0.1 mol/L PB缓冲液溶解,得到B液,将A液缓慢滴加到B液中,室温搅拌反应5 h。停止反应,0.02 M PBS缓冲液透析3天,每天换液三次,得到二甲戊灵-HSA免疫原,分装,-20℃保存,备用。

[0025] 包被原制备——二甲戊灵半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0026] 取二甲戊灵半抗原6 mg,加0.2 mL 二甲基甲酰胺(DMF)溶解,澄清,加三乙胺20 μL,搅拌5 min,加氯甲酸异丁酯6 μL,搅拌2 h,得到半抗原活化液A液;取OVA 50 mg,加8 mL 0.05 mol/L pH 7.2 PB缓冲液溶解,得到B液,将A液缓慢滴加到B液中,室温搅拌反应5 h。停止反应,0.02 M PBS缓冲液透析3天,每天换液三次,得到二甲戊灵-OVA包被原,分装,-20℃保存,备用。

[0027] 3、二甲戊灵单克隆抗体的制备

1) 杂交瘤细胞的获得

首次免疫:将二甲戊灵半抗原-HSA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;

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;

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;

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二甲戊灵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。

[0028] 2) 单克隆抗体的制备

细胞复苏:取出二甲戊灵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;

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5×10⁵个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化,得到二甲戊灵单克隆抗体溶液(-20℃保存)。

[0029] 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:(200000~500000)。

[0030] 间接竞争ELISA方法:用二甲戊灵半抗原-OVA偶联物包被酶标板,加入二甲戊灵标准品溶液、二甲戊灵单克隆抗体溶液,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。

[0031] 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。

[0032] 本实验将二甲戊灵、氟节胺、仲丁灵、氟乐灵、乙丁氟灵做系列稀释,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 (%) =	$\frac{\text{引起 } 50\% \text{ 抑制的二甲戊灵浓度}}{\text{引起 } 50\% \text{ 抑制的其他二硝基苯胺类除草剂浓度}} \times 100\%$
-------------	---

结果显示各类似物的交叉反应率为:二甲戊灵100%、氟节胺<1%、仲丁灵<1%、氟乐灵<1%、乙丁氟灵<1%。本发明抗体对氟节胺、仲丁灵、氟乐灵、乙丁氟灵等其他二硝基苯胺类除草剂无交叉反应,只针对二甲戊灵有特异性结合。

[0033] 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。

[0034] 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。

[0035] 6、酶标板的制备

用包被缓冲液将包被原(二甲戊灵半抗原-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。

[0036] 实施例2 检测二甲戊灵的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测二甲戊灵的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

- 1) 包被二甲戊灵偶联抗原的酶标板;
- 2) 二甲戊灵标准品溶液,浓度分别为0 μg/L、3 μg/L、9 μg/L、27 μg/L、81 μg/L、243 μg/L;
- 3) 二甲戊灵单克隆抗体工作液;
- 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A液和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的硫酸缓冲液；

7) 洗涤液为pH值为7.4,含有0.05%吐温-20、0.01%硫柳汞防腐剂的0.02 mol/L磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比；

8) 复溶液为pH值为7.0、0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0037] 实施例3 烟叶样本中二甲戊灵残留量的检测

1、样本前处理

称取 1.0 ± 0.05 g烟叶样本至10 mL聚苯乙烯离心管中,加入5 mL甲醇,涡旋振荡3 min, 6000 rpm室温(20–25 °C)离心5 min;移取上清液10 μL加入990 μL复溶液,充分混匀;取50 μL用于分析。

[0038] 2、用试剂盒检测

向包被有二甲戊灵偶联抗原的酶标板微孔中加入二甲戊灵标准品溶液或经前处理的样本溶液50 μL/孔,然后加入二甲戊灵单克隆抗体工作液50 μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25°C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;再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体100 μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25°C避光环境中反应30 min,取出重复洗板步骤;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°C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,参比波长620 nm,测定每孔吸光度值(OD值)。

[0039] 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。以二甲戊灵标准品浓度(μg/L)为X轴,百分吸光度值为Y轴,绘制标准曲线,如图3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二甲戊灵残留量则可从标准曲线上读出。

[0040] 实施例4 二甲戊灵酶联免疫试剂盒技术参数的确定

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3 μg/L,标准曲线的范围为3~243 μg/L,IC₅₀(50%抑制浓度)浮动范围为4.7~8.5 μg/L;对空白干烟叶样本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1.5 mg/kg。

[0041] 2、样本精密度和准确度试验

准确度是指测定值与真值间的符合程度,试剂盒的准确度常用回收率表示;精密度是反应测定方法对某一特定样本多次测定所得结果的重复程度,常用变异系数表示。向空白烟叶样本中添加二甲戊灵至终浓度为1.5、3、6 mg/kg进行添加回收测定,每个浓度做重复5次,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。

[0042] 表1 精密度及准确度试验

浓度 (mg/kg)	1.5			3			6		
批次	1	2	3	1	2	3	1	2	3
测定结果 (mg/kg)	1.45	1.53	1.28	2.87	2.30	2.75	4.83	4.76	5.41
	1.51	1.56	1.40	2.44	2.64	3.01	6.06	5.20	5.64
	1.39	1.25	1.13	2.86	2.65	2.79	5.55	5.18	5.06
	1.43	1.32	1.25	2.81	2.26	2.43	5.01	5.78	4.81
	1.22	1.53	1.35	2.98	2.54	2.76	5.92	5.32	5.92
变异系数 CV (%)	7.8	9.9	8.1	7.4	7.5	7.6	9.9	6.9	8.3

结果表明,向烟叶中添加至终浓度为1.5、3、6 mg/kg,回收率范围为75%~105%批内批间变异系数小于10%,符合《农业部文件》农医发[2005]17号附件2试剂盒备案参考评判标准中第四点精密度和准确度的规定。

[0043] 3、试剂盒稳定性试验

试剂盒保存条件为2~8℃,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、二甲戊灵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℃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℃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℃至少保存12个月以上。

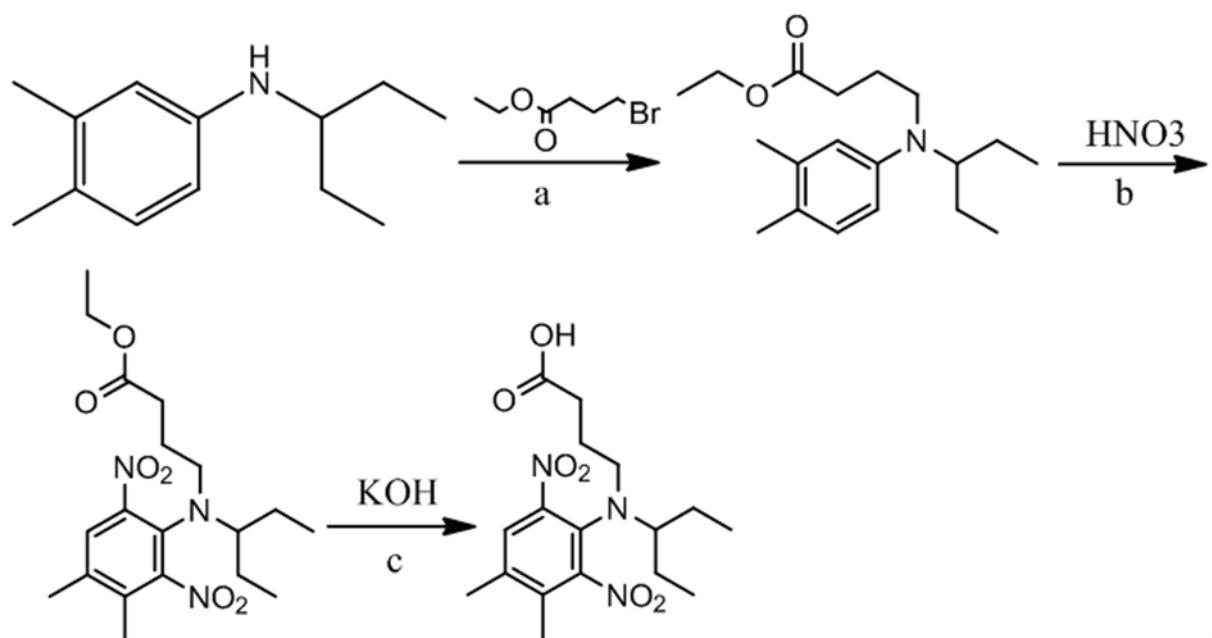


图1

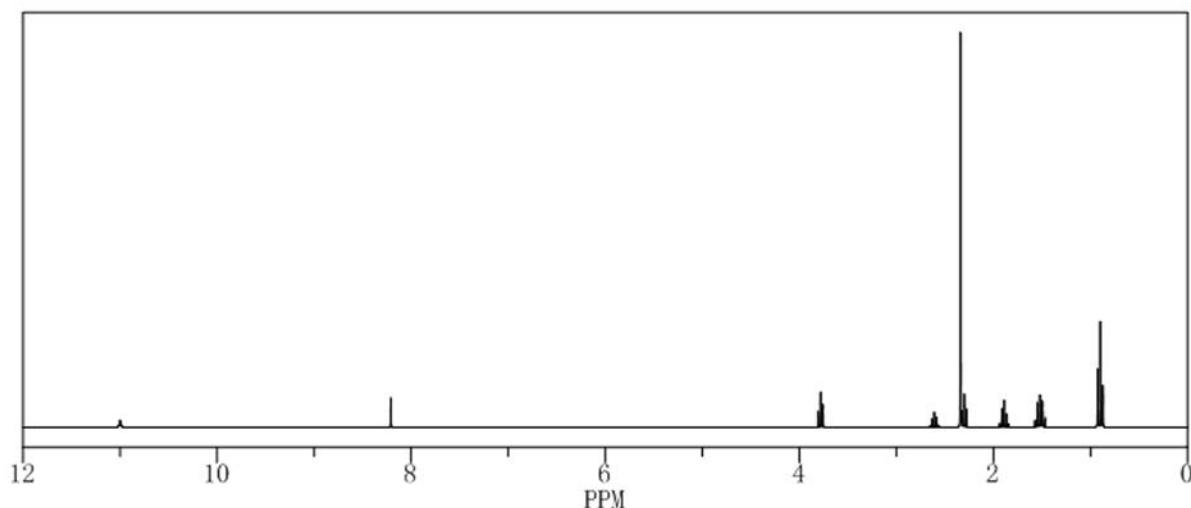


图2

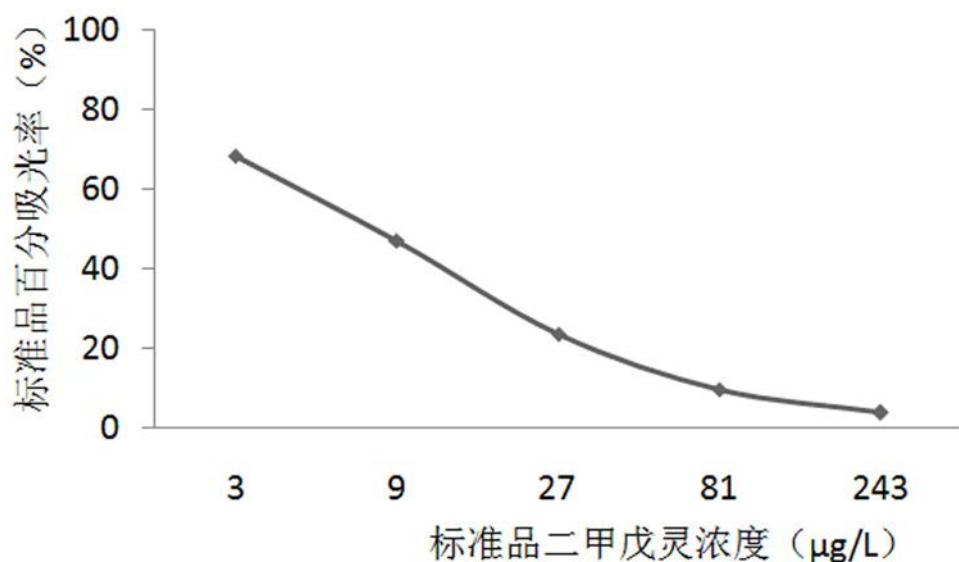


图3

专利名称(译)	一种检测二甲戊灵的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN109061170A	公开(公告)日	2018-12-21
申请号	CN201811104508.0	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	陈黎 范子彦 吴小胜 鲁亚辉 刘惠民 唐纲岭 颜权平 潘立宁 刘二战		
发明人	陈黎 范子彦 吴小胜 鲁亚辉 刘惠民 唐纲岭 颜权平 潘立宁 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)

一种检测二甲戊灵的酶联免疫试剂盒及其应用，它包括：包被有包被原的酶标板、二甲戊灵特异性抗体、酶标记物、二甲戊灵标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液；所述包被原为二甲戊灵偶联抗原，所述二甲戊灵特异性抗体是以二甲戊灵偶联抗原作为免疫原制备获得，所述二甲戊灵半抗原是由N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺与4-溴丁酸乙酯反应生成羟基化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺，再与浓硝酸反应生成硝基羟化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺，再与氢氧化钾反应得到。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测烟叶中二甲戊灵的残留量，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。

