



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109061171 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201811104751.2

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 何方洋 吴小胜
刘惠民 唐纲岭 颜权平 潘立宁
李旭

(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)

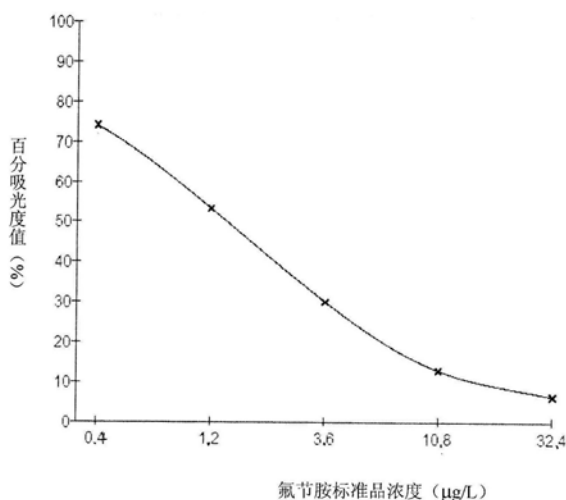
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

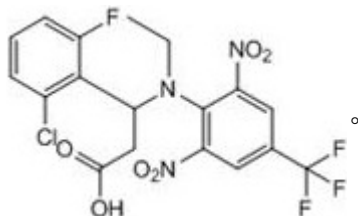
一种检测氟节胺的酶联免疫试剂盒及其应用

(57)摘要

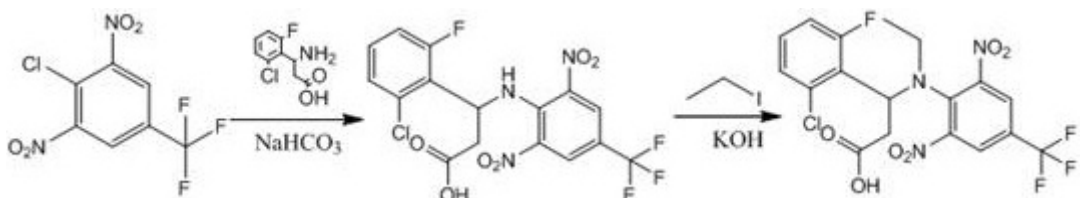
一种检测氟节胺的酶联免疫试剂盒及其应用,其特征是:该试剂盒包括:包被有包被原的酶标板、氟节胺标准品溶液、酶标二抗、氟节胺特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液;包被原为氟节胺偶联抗原,酶标二抗为酶标记的氟节胺二抗,氟节胺偶联抗原是由氟节胺半抗原与载体蛋白偶联得到,氟节胺半抗原是由2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯与3-氨基-3-(2-氯-6-氟苯基)-丙酸反应生成3-(2-氯-6-氟苯基)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基-苯氨基)-丙酸,再与碘乙烷反应得到。本发明的酶联免疫试剂盒可用于检测烟叶样本中氟节胺的含量,其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。



1. 一种检测氟节胺的酶联免疫试剂盒, 其特征在于: 包括包被有包被原的酶标板、氟节胺标准品溶液、酶标二抗、氟节胺特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液; 所述包被原为氟节胺偶联抗原, 所述酶标二抗为酶标记的氟节胺二抗, 所述氟节胺特异性抗体是以氟节胺偶联抗原作为免疫原制备获得, 所述氟节胺偶联抗原为氟节胺半抗原与载体蛋白的偶联物, 所述氟节胺半抗原是由2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯与3-氨基-3-(2-氯-6-氟苯基)-丙酸反应生成3-(2-氯-6-氟苯基)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基-苯氨基)-丙酸, 再与碘乙烷反应得到, 其分子结构式为:



2. 如权利要求1所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于: 所述氟节胺半抗原的制备反应过程如下:



3. 如权利要求1 所述的酶联免疫试剂盒, 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 所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于: 所述氟节胺特异性抗体可为氟节胺单克隆抗体或氟节胺多克隆抗体, 其中优选氟节胺单克隆抗体。

5. 如权利要求1 所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于: 所述酶标二抗中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; 当标记酶为辣根过氧化物酶时, 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, 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, 底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液, 终止液为1~2 mol/L氢氧化钠溶液。

6. 如权利要求1 所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于: 所述洗涤液优选为pH值为7.4, 含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01%~0.03%叠氮化钠、0.1~0.3 mol/L的磷酸盐缓冲液, 其中百分比为重量体积百分比; 所述复溶液为pH值为7.0、0.02 mol/L的磷酸盐缓冲液。

7. 如权利要求1 所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于: 所述氟节胺标准品溶液的浓度分别为0 $\mu\text{g/L}$ 、0.4 $\mu\text{g/L}$ 、1.2 $\mu\text{g/L}$ 、3.6 $\mu\text{g/L}$ 、10.8 $\mu\text{g/L}$ 、32.4 $\mu\text{g/L}$ 。

8. 一种应用权利要求1-7任一项所述的酶联免疫试剂盒检测氟节胺的方法, 其特征在于: 包括以下步骤:

- 1) 将待测样本进行前处理, 得到待测样本溶液;
- 2) 用氟节胺酶联免疫试剂盒检测待测样本溶液;
- 3) 分析检测结果。

一种检测氟节胺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氟节胺的酶联免疫试剂盒及其应用,可定性、定量检测烟叶中氟节胺的残留量。

背景技术

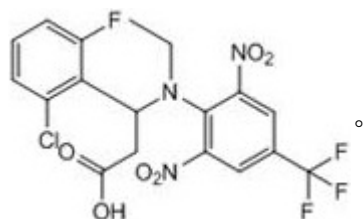
[0002] 氟节胺(flumetralin)是一种接触兼局部内吸型抑制烟草侧芽的二硝基苯胺类植物生长调节剂,它是优良的烟草抑芽剂。1977年由瑞士汽巴—嘉基(Ciba-Geigy)公司开发成功。1990年以抑芽敏(Prime)作为商品名在我国正式登记,登记号为PD116-90。它是一种在国际上较受欢迎的新型高效抑芽剂,适用于烤烟、明火烤烟、马里兰烟、晒烟、雪茄烟。国内浙江省化工研究院最早进行研究开发,并于1998年研制成功,1999年获得了农药临时登记。在烟草人工打顶24小时内施药一次,整个生长季节内不用抹芽。每亩用25%氟节胺乳油60-70 mL,其作用迅速,吸收快,只要施药后2 h无雨,即可奏效,雨季中施药方便。药剂接触完全伸展的叶片不会产生药害,不含有害残留物。使用氟节胺可以节省大量抹芽人工,并使自然成熟度一致,增加产量,提高烟叶上中级的比例和烟叶的内在品质。此外,使用氟节胺还可减轻田间花叶病的接触传染。与其它抑芽剂相比,氟节胺药效很高。国际烟草科学研究合作中心(CORESTA)规定烟草中氟节胺的指导性残留限量为5 mg/kg,我国尚未制定食品中氟节胺的最大残留限量。

[0003] 目前氟节胺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,等。但是由于这些分析方法需要昂贵的大型仪器设备和专业的检测人员、前处理过程复杂、操作繁琐、检测成本高、分析速度慢、检测结果滞后,难以满足现场监测和大量样本中农药残留量快速筛查的需要。因此,能否提供一种用酶联免疫法测定烟叶等样品中氟节胺残留量的试剂盒,正是本发明的研究重点。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种能够检测烟叶中氟节胺残留量的酶联免疫试剂盒,并提供一种高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检测方法。

[0005] 本发明的氟节胺酶联免疫试剂盒,包括:包被有包被原的酶标板、氟节胺标准品溶液、酶标二抗、氟节胺特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液;所述包被原为氟节胺偶联抗原,所述酶标二抗为酶标记的氟节胺二抗,所述氟节胺特异性抗体是以氟节胺偶联抗原作为免疫原制备获得,所述氟节胺偶联抗原为氟节胺半抗原与载体蛋白的偶联物,所述氟节胺半抗原是由2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯与3-氨基-3-(2-氯-6-氟苯基)-丙酸反应生成3-(2-氯-6-氟苯基)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基-苯氨基)-丙酸,再与碘乙烷反应得到,其分子结构式为:



[0006] 所述氟节胺半抗原的制备方法主要包括如下步骤:

1) 取2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯1.00 g,加20 mL无水乙醇溶解,得到A液;另取3-氨基-3-(2-氯-6-氟苯基)-丙酸0.88 g,加10 mL无水乙醇溶解,加1 mL含有0.37 g碳酸氢钠的水溶液,得到B液,将A液滴加到B液中,室温反应3 h;TLC检测,原料基本反应完全;停止反应,旋蒸,除去乙醇,加80 mL水溶解,用1 mol/L盐酸调节pH值到6,加80 mL乙酸乙酯振荡分层,有机相水洗,旋蒸,上硅胶柱,用体积比为10:1的正己烷与乙酸乙酯洗脱分离,得到中间体3-(2-氯-6-氟苯基)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基-苯氨基)-丙酸1.53 g;

2) 取中间体3-(2-氯-6-氟苯基)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基-苯氨基)-丙酸1.50 g加50 mL乙腈溶解,加氢氧化钾0.20 g,加碘乙烷0.57 g,50℃反应4 h,检测,原料反应完全,停止反应,旋蒸除去乙腈,加100 mL水,溶解,用1 mol/L盐酸调节pH值到6,加80 mL乙酸乙酯萃取,有机相水洗干燥,蒸干,得到黄色油状物,用体积比为1:1的正己烷与二氯甲烷溶液重结晶,得到氟节胺半抗原产物1.51 g。

[0007] 所述载体蛋白可为牛血清白蛋白、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。

[0008] 所述氟节胺特异性抗体可为氟节胺单克隆抗体或氟节胺多克隆抗体,其中优选氟节胺单克隆抗体。

[0009] 所述酶标二抗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;酶标二抗是由酶和氟节胺二抗偶联得到的。

[0010] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括氟节胺标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液。

[0011] 所述氟节胺标准品溶液6瓶,浓度分别为0 μg/L、0.4 μg/L、1.2 μg/L、3.6 μg/L、10.8 μg/L、32.4 μg/L。

[0012] 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。

[0013] 所述洗涤液优选为pH值为7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01%~0.03%叠氮化钠、0.1~0.3 mol/L的磷酸盐缓冲液,其中百分比为重量体积百分比,单位g/mL。

[0014] 所述复溶液优选为pH值为7.0、0.02 mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0015] 其中在酶标板制备过程中所用到的包被缓冲液为pH值为9.6,0.05 mol/L的碳酸盐缓冲液,封闭液为pH值为7.1~7.5,含有1%~3%(g/mL)酪蛋白、0.1~0.3 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,25℃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 μ L封闭液,25℃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] 本发明的检测原理为:

本试剂盒采用竞争ELISA方法,在酶标板微孔条上预包被偶联抗原,样本中残留的氟节胺和微孔条上预包被的偶联抗原竞争氟节胺单克隆抗体,加入酶标记抗抗体进行放大作用,用TMB底物显色,样本吸光值与其所含残留物氟节胺的含量成负相关,与标准曲线比较,再乘以其对应的稀释倍数,即可得出样本中氟节胺的残留量。

[0018] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测氟节胺的方法,它包括步骤:

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

[0019] 本发明检测氟节胺的酶联免疫试剂盒主要采用ELISA方法定性定量检测样品中氟节胺的含量;对样品的前处理要求低,样品前处理过程简单,能同时快速检测大批量样品;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,且能最大程度模拟氟节胺的分子结构,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

[0020] 图1:氟节胺半抗原合成路线图,

图2:试剂盒标准曲线图(该图为摘要附图)。

具体实施方式

[0021] 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。

[0022] 实施例1 试剂盒组分的制备

1、氟节胺半抗原的制备

取2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯1.00 g,加20 mL无水乙醇溶解,得到A液;另取3-氨基-3-(2-氯-6-氟苯基)-丙酸0.88 g,加10 mL无水乙醇溶解,加1 mL含有0.37 g碳酸氢钠的水溶液,得到B液,将A液滴加到B液中,室温反应3 h;TLC检测,原料基本反应完全;停止反应,旋蒸,除去乙醇,加80 mL水溶解,用1 mol/L盐酸调节pH值到6,加80 mL乙酸乙酯振荡分层,有机相水洗,旋蒸,上硅胶柱,用体积比为10:1的正己烷与乙酸乙酯洗脱分离,得到中间体3-(2-氯-6-氟苯基)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基-苯氨基)-丙酸1.53 g,收率92.17%;

取中间体3-(2-氯-6-氟苯基)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基-苯氨基)-丙酸1.50 g加50 mL乙腈溶解,加氢氧化钾0.20 g,加碘乙烷0.57 g,50℃反应4 h,检测,原料反应完全,停止反应,旋蒸除去乙腈,加100 mL水,溶解,用1 mol/L盐酸调节pH值到6,加80 mL乙酸乙酯萃取,有机相水洗干燥,蒸干,得到黄色油状物,用体积比为1:1的正己烷与二氯甲烷溶液重结晶,得到氟节胺半抗原产物1.51 g,收率94.97%。

[0023] 核磁鉴定¹H NMR(CDCl₃, 300MHZ) δ : 11.00 (1H, s), 7.141 (1H, dd, J=8.271, J=1.347), 7.373 (2H, dd, J=8.373, J=8.271), 4.23 (2H, dd, J=8.373, J=1.347), 2.880 (2H, d, J=6.843), 3.631 (2H, q, J=7.108), 1.238 (3H, t, J=7.108), 8.75 (2H, d, J=0.000), 化学位移 δ =11.0的为间隔臂上羧基氢共振吸收峰, δ =2.88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。

[0024] 2、抗原的制备

免疫原制备——氟节胺半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

[0025] 取氟节胺半抗原18 mg, 加0.3 mL二甲基甲酰胺(DMF)溶解, 澄清, 加碳二亚胺(EDC)8.6 mg, 搅拌, 澄清, 加N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)5.2 mg, 室温搅拌活化3 h, 得到A液; 取BSA 50 mg, 加8 mL 0.05 mol/L pH7.2 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, 得到氟节胺-BSA免疫原, 分装, -20℃保存, 备用。

[0026] 包被原制备——氟节胺半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0027] 取氟节胺半抗原8 mg, 加0.2 mL DMF溶解, 澄清, 加二环己基碳二亚胺(DCC)4.13 mg, 加NHS 2.3 mg, 室温搅拌2 h, 过滤, 除去沉淀物, 得到半抗原活化液A液; 取OVA 50 mg, 加8mL 0.05 mol/L pH7.2 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, 得到氟节胺-OVA包被原, 分装, -20℃保存, 备用。

[0028] 3、氟节胺单克隆抗体的制备

1) 动物免疫: 将上述步骤得到的免疫原注入到Balb/c小鼠体内, 免疫剂量为150 μ g/只, 使其产生抗血清。

[0029] 2) 细胞融合和克隆化: 小鼠血清测定结果较高后, 取其脾细胞, 按8:1(数量配比)比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合, 采用间接竞争ELISA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, 直到得到分泌氟节胺单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0030] 3) 细胞冻存和复苏: 将单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^6 个/mL的细胞悬液, 在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管, 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。

[0031] 4) 单克隆抗体的生产与纯化: 将Balb/c小鼠腹腔注入灭菌石蜡油0.5mL/只, 7天后腹腔注射稳定的单克隆杂交瘤细胞株 5×10^5 个/只, 7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化, -20℃保存。

[0032] 5) 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: (100000~400000)。

[0033] 间接竞争ELISA方法: 用氟节胺半抗原-OVA偶联物包被酶标板, 加入氟节胺标准品溶液、氟节胺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] 6) 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] 本实验将二硝基苯胺类除草剂(氟节胺、仲丁灵、二甲戊灵、氟乐灵)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 IC_{50} ,然后按下式计算交叉反应率:

交叉反应率 (%) =	引起 50%抑制的氟节胺浓度	×100%
	引起 50%抑制的其他二硝基苯胺类除草剂浓度	

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

[0036] 4、酶标二抗的制备

将氟节胺二抗与辣根过氧化物酶(HRP)进行偶联得到。

[0037] 5、酶标板的制备

用包被缓冲液将包被原稀释成20 $\mu\text{g/mL}$,每孔加入100 μL ,25℃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,25℃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。

[0038] 实施例2 检测氟节胺的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测氟节胺的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

- 1) 包被氟节胺偶联抗原的酶标板;
- 2) 氟节胺标准品溶液6瓶,浓度分别为0 $\mu\text{g/L}$ 、0.4 $\mu\text{g/L}$ 、1.2 $\mu\text{g/L}$ 、3.6 $\mu\text{g/L}$ 、10.8 $\mu\text{g/L}$ 、32.4 $\mu\text{g/L}$;
- 3) 用辣根过氧化物酶标记的氟节胺二抗;
- 4) 氟节胺特异性抗体工作液;
- 5) 底物显色液由A液和B液组成,A液为过氧化脲,B液为四甲基联苯胺;
- 6) 终止液为2 mol/L硫酸溶液;
- 7) 洗涤液为pH值为7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01%~0.03%叠氮化钠、0.1~0.3 mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;
- 8) 复溶液为pH值为7.0、0.02 mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0039] 实施例3 烟叶中氟节胺的检测

1、样品前处理

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 50%甲醇水溶液,用涡旋仪涡动3 min;6000 rpm室温离心5 min;取50 μL 上清液加入950 μL 复溶工作液,充分混匀;取50 μL 用于分析。

[0040] 2、用试剂盒检测

加标准品/样本50 μL 到对应的微孔中,再加入抗体工作液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。小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液250 μL /孔,充分洗涤4-5次,每次间隔10 s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破)。加入酶标二抗100 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,取出重复洗板。加入底物液A液50 μL /孔,再加底物液B液50 μL /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中显色15 min。加入终止液50 μL

/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450 nm处(建议用双波长450/630 nm检测,5 min内读完数据),测定每孔OD值。

[0041] 3、检测结果分析

标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准品(0标准)的吸光度值的平均值,再乘以100%,得到标准品或样本的百分吸光度值。以标准品百分吸光率为纵坐标,以氟节胺标准品浓度($\mu\text{g/L}$)为横坐标,绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中氟节胺的实际浓度。

[0042] 实施例4 氟节胺技术参数的确定

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,标准曲线的范围为0~32.4 $\mu\text{g/L}$, IC_{50} (50%抑制浓度)浮动范围为1.3~4.5 $\mu\text{g/L}$;对20份样品进行检测,从标准曲线上查出对应于各百分吸光率的浓度,以20份样本浓度的平均值加上3倍标准差表示检测限,结果显示,该方法对烟叶的检测限为0.05 mg/kg。

[0043] 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,重复测定某一浓度样品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%,其中理论值为样品的添加浓度;相对标准偏差 $\text{RSD}\% = \text{SD}/\text{X} \times 100\%$,其中SD为标准偏差,X为测定数据的平均值。

[0044] 按0.05 mg/kg、0.5 mg/kg两个浓度的氟节胺分别对烟叶样品进行添加回收测定,每个样品做4个平行,用三批不同试剂进行测定,计算样品的平均回收率及精密度结果见下表。

表1 精密度及准确度试验

氟节胺	添加浓度 (mg/kg)	回收率范围 (n=4)%	批内RSD(n=4)%	批间RSD(n=3)%
烟叶	0.05	81.4~93.8	7.6	9.0
	0.5	85.9~96.7	8.8	9.3

[0045]

[0046] 以0.05 mg/kg、0.5 mg/kg两个浓度的氟节胺分别对烟叶进行添加,烟叶的平均回收率在81.4%~96.7%之间;批内、批间相对标准偏差均小于10%。

[0047] 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、氟节胺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。

[0048] 4、试剂盒特异性

试剂盒对500 $\mu\text{g/L}$ 的二甲戊灵、仲丁灵、氟乐灵等二硝基苯胺类除草剂无交叉反应,特异性良好。

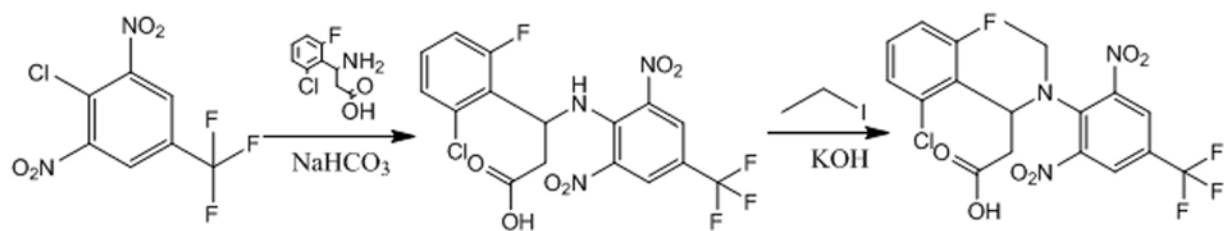


图1

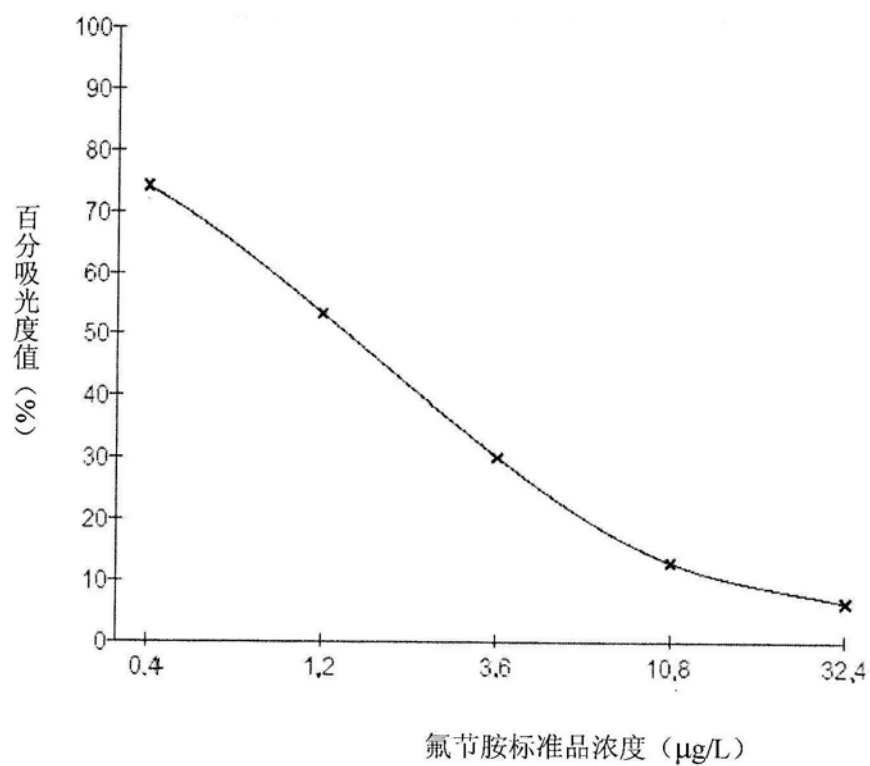


图2

专利名称(译)	一种检测氟节胺的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN109061171A	公开(公告)日	2018-12-21
申请号	CN201811104751.2	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 何方洋 吴小胜 刘惠民 唐纲岭 颜权平 潘立宁 李旭		
发明人	陈黎 范子彦 何方洋 吴小胜 刘惠民 唐纲岭 颜权平 潘立宁 李旭		
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)

一种检测氟节胺的酶联免疫试剂盒及其应用，其特征是：该试剂盒包括：包被有包被原的酶标板、氟节胺标准品溶液、酶标二抗、氟节胺特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液；包被原为氟节胺偶联抗原，酶标二抗为酶标记的氟节胺二抗，氟节胺偶联抗原是由氟节胺半抗原与载体蛋白偶联得到，氟节胺半抗原是由2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯与3-氨基-3-(2-氯-6-氟苯基)-丙酸反应生成3-(2-氯-6-氟苯基)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基-苯氨基)-丙酸，再与碘乙烷反应得到。本发明的酶联免疫试剂盒可用于检测烟叶样本中氟节胺的含量，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。

