

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710105596.1

[51] Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2008年4月9日

[11] 公开号 CN 101158683A

[22] 申请日 2007.5.16

[21] 申请号 200710105596.1

[71] 申请人 山东省农业科学院植物保护研究所

地址 250100 山东省济南市历城区桑园路 28 号

[72] 发明人 王升吉 尚佑芬 赵玖华 杨崇良
马立平 崔汉青 路兴波 孙红炜
袁雪英

权利要求书 3 页 说明书 6 页 附图 1 页

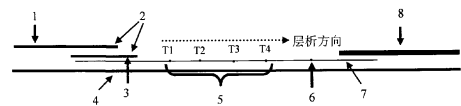
[54] 发明名称

胶体金层析法半定量检测 2,4-D 的试纸条及其制备方法

[57] 摘要

本发明属免疫化学检测技术，是一种借助胶体金标记显色的免疫层析反应，用以快速半定量检测环境水样中 2,4-D 残留量的试纸及制备方法。本发明所依据的原理是通过待检样品中的 2,4-D 与精确定量金标抗体反应，然后与呈横条状分布于免疫层析膜上的 2,4-D-OVA 发生竞争性的结合，通过显示于免疫层析膜上的条纹数量，来判定待检样品中 2,4-D 的含量，条纹数越多，待检样品中 2,4-D 的含量越高，对 2,4-D 的最小检出量为 21ug/l，可在 10 分钟内完成，具有实质性特点和显著进步，改变了传统的农药残留多步繁琐检测问题，实现一步法快速半定量检测 2,4-D 残留的方法。该试纸条由底板、吸水滤纸、硝酸纤维素膜、抗 2,4-D 抗体的金标垫、样品吸收垫组成，底板

中部为作为实验反应区的硝酸纤维素膜，其上有含 4 条检测线和一条质控线，最左侧为样品区，底板另一端头为吸水滤纸。



1、一种 2,4-D 农药残留的半定量纳米胶体金层析测定方法，其具体步骤为，①半抗原的选择：通过比较，选择 2,4-DB 为合成人工免疫抗原的半抗原，2,4-D 为合成人工包被抗原的半抗原；②人工抗原的合成：以改良 EDC 法将 2,4-D 免疫半抗原 2,4-DB 与 BSA 偶联，合成人工免疫抗原 2,4-DB—BSA；③抗 2,4-D 特异性抗体的制备：利用上述合成的偶联物 2,4-DB—BSA 免疫动物制备效价高特异性强的抗 2,4-D 抗体；④纳米胶体金颗粒的制备：使用氯金酸和柠檬酸三钠为反应试剂用煮沸法制备胶体金纳米颗粒；⑤胶体金标记抗 2,4-D 特异性抗体：抗 2,4-D 抗体经分离纯化后，将制备的胶体金颗粒标记于抗 2,4-D 的特异性抗体上；⑥金标垫的制备和硝酸纤维素膜的处理：将胶体金标记的抗 2,4-D 抗体固定在玻璃纤维素膜上；2,4-D—OVA 包被原固相化喷涂 4 条检测线组成检测区，羊抗兔 IgG（或羊抗鼠 IgG）1.0mg/ml 喷涂于质控线，硝酸纤维素膜上 1、2、3、4 检测线上喷涂 2,4-D—OVA 量刚好与金标垫上标记抗体中和；⑦免疫层析试纸条的制备：单面胶 PVC 板上，依次粘贴上玻璃纤维素膜、已固定金标记抗 2,4-D 抗体的玻璃纤维素膜、已平行包被 2,4-D—OVA 包被原检测线和羊抗鼠（或羊抗兔）IgG 抗体的硝酸纤维素膜、吸水垫。用切条机将已粘贴好的 PVC 板沿纵向切成 5mm×60mm 的试纸条；⑧样品测试和结果判读方法：根据竞争抑制免疫层析原理，进行农药残留的分析测定；建立的检测体系对 2,4-D 农药的最小检测量为 21ug/ml，且可实现半定量显示，在 5 分钟内完成快速检测。

2、根据权利要求 1 所述的 2,4-D 农药残留的半定量纳米胶体金层析测定方法，其特征是，所涉及步骤①的具体为：制备 2,4-D 抗体可方便选择 2,4-D 或 2,4-DB 为半抗原，但通过比较，2,4-DB 为半抗原较 2,4-D 做半抗原更具科学性，2,4-DB 与 2,4-D 分子结构类似，只是 2,4-DB 较 2,4-D 天然具有较长的碳链间隔臂（增加 2 个碳的碳链长），更易使半抗原的分子独特部位暴露（即突出抗原决定簇），而增强免疫性。因此本项选择 2,4-DB 为合成人工免疫抗原的半抗原，而为了提高检测灵敏度，人工包被抗原合成选择的半抗原为 2,4-D。

3、根据权利要求 1 所述的 2,4-D 农药残留的半定量纳米胶体金层析测定方法，其特征是，所涉及的步骤②的具体为：选择 2,4-DB 为 2,4-D 抗体制备的半抗原，牛血清白蛋白（BSA）为载体蛋白，然后通过改良 EDC 法合成人工抗原 2,4-DB—BSA。称取 2,4-DB 60mg，加入 0.05M PB(PH 11 以上)，搅拌使其缓慢溶解，之后调节 PH 值至 7.2 左右，加入 60mg sulf-NHS，充分混合，再加入 EDC，再加入 90mgEDC，搅匀，静置片刻，并将此反应液 1 小时内缓慢滴加到事先配好的 60mg 9ml BSA 溶液中，4℃下搅拌反应过夜，0.15M NaCl 液透析 3 天，5-6 次左右，紫外分光光度计测紫外法测定和计算偶联物的结合比，得到适当结合比的 2,4-DB—BSA 偶联物，-20℃下冻存。制备人工免疫抗原过程中，同时进行人工包被抗原的合成，以 2,4-D 为半抗原，卵清蛋白 OVA 为载体蛋白，改良 EDC 法合成包被抗原 2,4-D—OVA。

4、根据权利要求 1 所述的 2,4-D 农药残留的半定量纳米胶体金层析测定方法，其特征是，所涉及的步骤③的具体为：获得的人工抗原（偶联物）免疫 BALB/c 小鼠或新西兰白雄兔。免疫 BALB/c 小鼠采用腹部

皮下注射，初次免疫剂量 300ug/鼠，与佛氏完全佐剂等量混合充分乳化，加强免疫时剂量为首免的 1/4，与等量不完全佐剂混合充分乳化后注射，上下 2 次免疫间隔 2-3 周。采用 ELISA 法检测抗血清效价，待抗血清效价达一定值后，再加强一次。通过外科手术取免疫鼠脾细胞，与小鼠骨髓瘤细胞系 P3/X63-Ag8 融合，HAT 筛选并克隆化，筛选出能稳定分泌抗 2,4-D 单克隆抗体的细胞株，该细胞株注入小鼠腹腔，取腹水制备单抗。分离纯化抗体，然后用 ELISA 法做抗体效价和亲合性、特异性的测定。

5、根据权利要求 1 所述的 2,4-D 农药残留的半定量纳米胶体金层析测定方法，其特征是，所涉及的步骤④的具体为：纯水溶解氯金酸使其终浓度为 0.01%。煮沸后每 100ml 加入 1%柠檬酸三钠水溶液 3ml，继续煮沸 3min。待冷却后用 0.2M 的 K_2CO_3 调至 PH 8.2。冷却后 4℃ 保存备用，取样进行透射电镜观察粒子大小。

6、根据权利要求 1 所述的 2,4-D 农药残留的半定量纳米胶体金层析测定方法，其特征是，所涉及的步骤⑤的具体为：在磁力搅拌下，将 1.4mg 纯化的抗 2,4-D 特异性抗体 IgG，快速搅拌下加入上述 100ml 胶体金溶液中，室温搅拌 30min 后，加 10%牛血清白蛋白 4ml，再搅拌 5min，加 10%聚乙二醇(PEG2000)2ml(终浓度为 0.2%)，室温下搅拌 5min，12000rpm 离心 50min，吸去上清后所得沉淀即为纯化的金标记抗体，将其贮存于保存液中，4℃ 冰箱中保存。

7、根据权利要求 1 所述的 2,4-D 农药残留的半定量纳米胶体金层析测定方法，其特征是，所涉及的步骤⑥的具体为：稀释金标抗体至工作浓度，按 $50\mu l/cm^2$ 的量均匀喷涂于玻璃纤维素膜上，-20℃ 冻存，冷冻真空干燥后，密封保存。硝酸纤维膜上将 2,4-D—OVA 包被原固相化喷涂 4 条检测线组成检测区，每条检测线宽度 1-1.5mm，每条线在 0.5cm 宽的试纸条上点样量 25ul，条带间隔 2mm，如图自左至右依次为第 1、2、3、4 线，2,4-DB—OVA 包被原浓度按照 4、3、2、1 的次序依次递增，点样液浓度依次为 60ng/ml、600ng/ml、6ug/ml、60ug/ml。且 4 条检测线上包被原的总量刚好可与金标垫上的金标抗体完全中和。羊抗兔 IgG (或羊抗鼠 IgG) 1.0mg/ml 喷涂于硝酸纤维素膜上形成质控线，用含 1%BSA、0.5% Tween-20 的 PBS 封闭 30min，洗涤 3 次，自然风干。

8、根据权利要求 1 所述的 2,4-D 农药残留的半定量纳米胶体金层析测定方法，其特征是，所涉及的步骤⑦的具体为：试纸结构底板中部为作为实验反应区的硝酸纤维素膜，其上有含 4 条涂有 2,4-D—OVA 偶联物线的检测区和一条指示试纸条质量的质控带 C，最左侧为样品区，底板另一端头为吸水滤纸，硝酸纤维素膜二端分别与抗体金标垫和吸水滤纸相互交叠连接，在抗体金标垫上压有作为样品吸收区的玻璃纤维膜，这 4 部分均贴附于白色双面胶塑料底板上。组装好后，用切条机将已粘贴好的免疫层析试纸沿纵向切成 $5mm \times 60mm$ 的试纸条。

9、根据权利要求 1 所述的 2,4-D 农药残留的半定量纳米胶体金层析测定方法，其特征是，所涉及的步骤⑧的具体为：将试纸条样品吸收垫插入待测样品中，停留 5 秒后取出平放，10 分钟后观察结果。结果判断方法是通过显示于免疫层析膜上的条纹数量，来判定待检样品中 2,4-D 的含量。当样品中不含 2,4-D 时，玻璃纤维膜上的胶体金抗 2,4-D 抗体量刚可使硝酸纤维素膜上 4 条检测线显色，质控线也显色；当样品中

2,4-D 为低含量时 (21-100ng/ml), 检测线 1、2、3 和质控线显色、检测线 4 不显色; 样品中 2,4-D 为中低含量时 (200-600ng/ml), 检测线 1、2 和质控线显色, 第 3、4 条检测线不显色; 样品中 2,4-D 为中度含量时(1-6mg/ml), 检测线 1 和质控线显色, 检测线 2、3、4 不显色; 样品中 2,4-D 为高含量时(>10mg/l), 检测线 1、2、3、4 均不显色, 只质控线显色。

胶体金层析法半定量检测 2, 4-D 的试纸条及其制备方法

技术领域

本发明属于免疫化学检测技术, 具体来讲, 是一种借助胶体金显色的免疫层析反应, 用以快速检测农产品、水、土壤中的 2, 4-D 农药残留。

背景技术

2, 4-D 是在生产上广泛使用的除草剂和植物生长调节剂, 其在农产品、水和土壤中的残留危害不容忽视, 如其在土壤、水中残留超标, 易引起棉花、某些蔬菜、林木的毒害, 对人类的健康造成较大危害, 据报道, 2, 4-D 具潜在的致癌性、致突变性, 是一种内分泌干扰物质, 对免疫系统和生育系统具不良影响, 人体摄入吸收后对眼睛、皮肤也有刺激作用, 反复接触后对肝、心脏有损害作用, 能引起惊厥等。鉴于此, 有些国家和世界卫生组织都在环境标准中对 2, 4-D 做出了严格的规定, 世界卫生组织 2003 年 8 月颁布《饮用水水质指南》, 规定饮用水中 2, 4-D 的最大检出浓度 30ug/l, 我国 2001 年颁布的《饮用水水质卫生规范》的非常规检测项目中, 将 2, 4-D 的限制规定为 0.03mg/l。迄今为止, 对其残留量的常规检测分析主要是利用气相色谱 (GC) 和高效液相色谱 (HPLC) 等仪器在试验室操作, 方法繁琐、分析速度慢、成本高, 要求仪器化程度高等。随着待检样品、特别是要求现场快速检测样品量的迅速增加, 传统的农药残留分析手段难以适应要求, 因此, 迫切需要开发和应用高效率农药残留分析技术。

通过大量资料检索, 注意到: 2,4-二氯苯氧乙酸完全抗原和抗体的制备 (中国环境科学, 2005, 25 (3): 288~292), 所列文献合成了 2, 4-D 人工免疫抗原, 并将该人工免疫抗原免疫家兔制备多克隆抗体, 在此基础上建立了间接酶联免疫吸附测定检测 2, 4-D 农药残留的技术。该技术较 CG、HPLC 有较大革新, 使检测时间缩短、成本大大降低, 灵敏度提高, 有利于在食品、土壤、水和环境中 2, 4-D 农药残留的快速检测并推广应用, 但其方法还存在操作相对繁琐、需重复多次洗涤, 需借助酶标仪读数等, 不能实现真正意义上的一步法快速测定。还有 Investigation of highly sensitive piezoelectric immunosensors for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Biosen. & Bioelectro. 2001,16:253-260. (2,4-D 高灵敏度的压电式免疫传感器的研究, 生物传感器与生物电学, 2001,16,253-260), 生物传感器是一种以生物活性单元为敏感元件, 结合化学、物理转换元件, 对被分析物具有高度选择性的仪器, 农药残留分析时灵敏度高, 该法在即时检验领域可发挥很大作用, 但因为该法仍需一定的仪器设备条件, 不易进一步降低检测成本。

胶体金免疫层析技术是近些年来发展起来的一种简单、快速免疫学检测方法, 具灵敏、简便、快速、无需设备和仪器、经济实用、具高度特异性和敏感性、结果直观可靠、试剂和样品用量极少、不需专业人员操作, 易于推广使用, 正可以满足这种需求。

发明内容:

本发明的目的在于克服现有技术中的不足, 提供一种 2, 4-D 农药免疫胶体金标记测定方法, 改变 2, 4-D

农药残留多步繁琐检测问题, 实现廉价、一步法快速检测 2, 4-D 农药残留的方法。

本发明通过以下技术方案解决技术问题, 以改良 EDC 法将 2, 4-D 半抗原 2, 4-DB 与 BSA 偶联, 即 EDC 介导的缩合反应, 在 Sulf-NHS 同时存在时, 效率大大提高; 合成人工免疫抗原 2, 4-DB-BSA, 免疫 BALB/c 小鼠或新西兰雄白兔, 制备特异性高效价抗 2, 4-D 抗体, 抗体经分离纯化后, 将纳米级的胶体金颗粒标记于抗 2, 4-D 的特异性抗体上, 并将此标记物、偶联卵清蛋白的 2, 4-D 包被原、以及羊抗鼠 (兔) IgG 分别固化在同一载体上, 根据竞争抑制免疫层析原理, 进行 2, 4-D 农药的半定量分析测定, 建立的检测体系对 2, 4-D 农药的最小检测量为 21ug/1, 且在 10 分钟内完成, 方法简单、准确、稳定, 是真正意义上的一步法农药残留快速测定。以下是本发明的具体实施步骤:

(1) 半抗原的选择:

制备 2, 4-D 抗体可方便选择 2, 4-D 或 2, 4-DB 为半抗原, 但通过比较, 2, 4-DB 为半抗原较 2, 4-D 做半抗原更具科学性, 因 2, 4-DB 分子结构与 2, 4-D 结构类似, 都具类似苯环的管能团和做为活性基团的羧基, 二者由一定碳链长度的间隔臂组成, 2, 4-DB 较 2, 4-D 天然具有较长碳链间隔臂 (增加 2 个碳的碳链长), 更易使半抗原的分子独特部位暴露 (即突出抗原决定簇) 而增强免疫性, 因此本项选择 2, 4-DB 为合成人工免疫抗原的半抗原, 而为了提高检测灵敏度, 人工包被抗原合成选择的半抗原为 2, 4-D。

(2) 人工抗原的合成:

选择 2, 4-DB 为 2, 4-D 抗体制备的半抗原, 牛血清白蛋白 (BSA) 为载体蛋白, 然后通过改良 EDC 法合成人工抗原 2, 4-DB-BSA。称取 2, 4-DB 60mg, 加入 0.05M PB (PH 11 以上), 搅拌使其缓慢溶解, 之后调节 PH 值至 7.2 左右, 加入 60mg sulf-NHS, 充分混合, 再加入 EDC, 再加入 90mg EDC, 搅匀, 静置片刻, 并将此反应液 1 小时内缓慢滴加到事先配好的 60mg 9ml BSA 溶液中, 并 4℃ 下搅拌反应过夜, 0.15M NaCl 液透析 3 天, 5-6 次左右, 紫外分光光度计测紫外法测定和计算偶联物的结合比, 得到适当结合比的 2, 4-DB-BSA 偶联物, -20℃ 下冻存。制备人工免疫抗原过程中, 同时进行人工包被抗原的合成, 以 2, 4-D 为半抗原, 卵清蛋白 OVA 为载体蛋白, 改良 EDC 法合成包被抗原 2, 4-D-OVA。

(3) 动物免疫试验制备 2, 4-D 的特异性抗体:

获得的人工抗原 (偶联物) 免疫 BALB/c 小鼠或新西兰白雄兔。免疫 BALB/c 小鼠采用腹部皮下注射, 初次免疫剂量 300ug/鼠, 与佛氏完全佐剂等量混合充分乳化, 加强免疫时剂量为首免的 1/4, 与等量不完全佐剂混合充分乳化后注射, 上下 2 次免疫间隔 2-3 周。采用 ELISA 法检测抗血清效价, 待抗血清效价达一定值后, 再加强一次。通过外科手术取免疫鼠脾细胞, 与小鼠骨髓瘤细胞系 P3/X63-Ag8 融合, HAT 筛选并克隆化, 筛选出能稳定分泌抗 2, 4-D 单克隆抗体的细胞株, 该细胞株注入小鼠腹腔, 取腹水制备单抗。分离纯化抗体, 然后用 ELISA 法做抗体效价和亲合性、特异性的测定。

若免疫新西兰白兔, 采用背部皮下多点法注射。初次免疫人工抗原与等量佛氏完全佐剂充分乳化, 加强免疫与等量不完全佐剂乳化, 初次免疫的免疫剂量为 0.9mg/兔, 加强免疫的免疫剂量为 0.45mg/兔, 每

次免疫时间间隔为 2 周，共免疫 6 次，最后一次免疫后 10 天采血收集血清，以 ELISA 法测定抗血清的效价，待抗血清达到一定效价后，采取兔心脏采血法获取血液，析出抗血清加入 0.01% 硫柳汞，分装后于 -20℃ 冻存，或获得的抗血清立即分离纯化抗体，然后用 ELISA 做抗体效价和亲合性、特异性的测定。

(4) 纳米胶体金颗粒的制备

纯水溶解氯金酸使其终浓度为 0.01%。煮沸后每 100ml 加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 3ml，继续煮沸 3min。待冷却后用 0.2M 的 K_2CO_3 调至 PH 8.2。冷却后 4℃ 保存备用，取样进行透射电镜观察粒子大小。

(5) 免疫胶体金的制备

在磁力搅拌下，将 1.4mg 纯化的抗 2,4-D 特异性抗体 IgG，快速搅拌下加入上述 100ml 胶体金溶液中，室温搅拌 30min 后，加 10% 牛血清白蛋白 4ml，再搅拌 5min，加 10% 聚乙二醇(PEG2000)2ml (终浓度为 0.2%)，室温下搅拌 5min，12000rpm 离心 50min，吸去上清后所得沉淀即为纯化的金标记抗体，将其贮存于保存液中，4℃ 冰箱中保存。

(6) 金标垫的制备

由保存液稀释金标抗体至工作浓度，按 50ul/cm² 的量均匀喷涂于玻璃纤维素膜上，并由此确定单位面积上附着金标抗体的量，使其与下步处理硝酸纤维素膜上 4 条检测条线包被原的量刚好完全中和，-20℃ 冻存，冷冻真空干燥后，密封保存。

(7) 硝酸纤维素膜的处理

硝酸纤维膜上用微量点膜头将 2,4-D—OVA 包被原固相化喷涂检测区内 4 条检测线，每条检测线宽度 1-1.5mm，在 0.5cm 宽的试纸条上点样量为 25ul，各条带间隔 2mm，如图所示自左至右依次为第 1、2、3、4 线，4 条线中 2,4-DB—OVA 偶联物溶液浓度按照 4、3、2、1 的次序依次递增，点样液浓度依次为 60ng/ml、600ng/ml、6ug/ml、60ug/ml。且 1、2、3、4 检测线上包被原的总量刚好可与金标垫上的金标抗体完全中和。羊抗兔 IgG (或羊抗鼠 IgG) 1.0mg/ml 喷涂于硝酸纤维素膜上形成质控线。用含 1%BSA、0.5% Tween-20 的 PBS 封闭 30min，洗涤 3 次，自然风干。

(8) 胶体金免疫层析试纸条的制备

由底板、吸水滤纸、硝酸纤维膜、抗 2,4-D 抗体的金标垫、样品吸收垫组成 (如图)。底板中部为作为实验反应区的硝酸纤维素膜，其上有含 4 条涂有 2,4-D—OVA 偶联物线的检测区和一条指示试纸条质量的质控带 C，最左侧为样品区，底板另一端头为吸水滤纸，硝酸纤维素膜二端分别与吸水滤纸和抗体金标垫相互交叠连接，在抗体金标垫上压有作为样品吸收区的玻璃纤维膜，这 4 部分均贴附于白色双面胶塑料底板上。用切条机将已粘贴好的免疫层析试纸沿纵向切成 5mm×60mm 的试纸条。

(9) 样品测试和结果判读

将试纸条样品吸收垫插入待测样品中，停留 5 秒后取出平放，10 分钟后观察结果。结果判断方法是通过显示于免疫层析膜上的条纹数量，来判定待检样品中 2,4-D 的含量。当样品中不含 2,4-D 时，玻璃纤维膜上的胶体金-抗 2,4-D 抗体量刚可使硝酸纤维素膜上 4 条检测线显色，质控线也显色；当样品中 2,4-D

为低含量时 (21-100ng/ml), 检测线 1、2、3 和质控线显色、检测线 4 不显色; 样品中 2,4-D 为中低含量时 (200-600ng/ml), 检测线 1、2 和质控线显色, 第 3、4 条检测线不显色; 样品中 2,4-D 为中度含量时 (1-6mg/ml), 检测线 1 和质控线显色, 检测线 2、3、4 不显色; 样品中 2,4-D 为高度含量时 (>10mg/l), 检测线 1、2、3、4 均不显色, 只质控线显色。

本发明具有实质性特点和显著进步, 主要表现为反应操作简便, 灵敏度高而稳定、产品易于保存, 不需繁琐的洗涤环节, 检测速度快, 整个反应在 10 分钟内完成, 真正达到一步法快速检测样品中特测农药是否超标目的。

具体实施方式:

实施例 1

采用改良 EDC 法合成 2,4-D 免疫用人工抗原, 以 2,4-DB 为半抗原, 牛血清白蛋白 (BSA) 为载体蛋白, 称取 2,4-DB 60mg, 加入 0.05M PB (PH 11 以上), 搅拌使其缓慢溶解, 之后调节 PH 值至 7.2 左右, 加入 60mg sulf-NHS, 充分混合, 静置 5min, 再加入 90mg EDC, 搅匀, 静置 5min, 该反应液 1 小时内缓慢滴加到 60mg 9ml 的 BSA 溶液中, 并 4℃ 下搅拌反应过夜, 接着用 0.15M NaCl 液透析 5-6 次, 8 小时/次, 之后采用光谱测定法偶联物的结合比, 得到结合比为 1:24 的 2,4-DB—BSA 偶联物, 分装冻存于 -20℃ 冰箱中。制备人工抗原过程中, 同时进行包被抗原的合成, 方法为以 2,4-D 60mg 代替 2,4-DB, 按同样方法与 60mg 9ml 的 OVA 溶液反应, 合成包被抗原 2,4-D—OVA。

获得的人工抗原 2,4-DB—BSA 免疫 10 周龄的 BALB/c 小鼠, 初次免疫用等量的佛氏完全佐剂乳化人工抗原, 进行腹部皮下注射, 抗原剂量为 300ug, 然后以佛氏不完全佐剂乳化人工抗原, 剂量约为首次剂量的 1/4, 进行 6 次加强免疫, 每次间隔 2-3 周, 采用 ELISA 法检测抗血清效价, 待抗血清效价达到一定的值后, 再加强一次, 3 天后外科手术取免疫鼠脾细胞, 与小鼠骨髓瘤细胞系 P3/X63-Ag8 融合, HAT 筛选并进行克隆化, 筛选出能稳定分泌抗 2,4-D 单克隆抗体的细胞株, 该细胞株注入小鼠腹腔, 取腹水制备单抗, 分离纯化, 然后用 ELISA 法做抗体效价和抗体亲合性、特异性的测定。

取 700ug 纯化单克隆抗体, 边搅拌边注入预先制备的 30nm 大小的胶体金溶液 100ml (PH 8.2) 中, 室温搅拌 30min, 加 10%BSA 搅 5min, 加 10% PEG2000 2ml, 搅拌 5min, 12000rpm 离心 50min, 吸去上清, 沉淀即为纯化的金标记抗体。由保存液稀释金标抗体至工作浓度, 按 50ul/cm² 的量均匀喷涂于玻璃纤维素膜上, 并由此确定单位面积上附着金标抗体的量, 使其与处理过硝酸纤维素膜上 4 条检测条线包被原的量刚好完全中和。-20℃ 冻存, 冷冻真空干燥后, 密封保存。将 2,4-DB—OVA 偶联物喷涂于硝酸纤维素膜检测区内的 4 条检测线上, 每线宽 0.5cm, 点样量 25ul, 各条带间隔 2mm, 自左至右依次为第 1、2、3、4 线, 2,4-D 包被原溶液浓度按 4、3、2、1 的次序递增, 点样液浓度依次为 60ng/ml、600ng/ml、6ug/ml、60ug/ml, 且 4 条检测线上包被原的总量刚好可与金标垫上的金标记抗体完全中和。羊抗鼠 IgG 1.0mg/ml 喷涂于质控线上。然后将玻璃纤维素膜、已固定金标记抗 2,4-D 抗体的玻璃纤维素膜、已平行包被 2,4-D—OVA 偶

联物和羊抗兔 IgG 抗体的硝酸纤维素膜、吸水垫依次粘贴到 50mm×240mm 单面胶 PVC 板上。用切条机将其沿纵向切成 5mm×60mm 的试纸条。

测定样品时，将试纸条样品吸收垫插入待测样品中，停留 5 秒后取出平放，5 分钟后观察结果。结果判断方法是通过显示于免疫层析膜上的条纹数量，来判定待检样品中 2,4-D 的含量。当样品中不含 2,4-D 时，玻璃纤维膜上的胶体金-抗 2,4-D 抗体量刚可使硝酸纤维素膜上 4 条检测线显色，质控线也显色；当样品中 2,4-D 为低含量时 (21-100ng/ml)，检测线 1、2、3 和质控线显色、检测线 4 不显色；样品中 2,4-D 为中低含量时 (200-600ng/ml)，检测线 1、2 和质控线显色，第 3、4 条检测线不显色；样品中 2,4-D 为中度含量时 (1-6mg/ml)，检测线 1 和质控线显色，检测线 2、3、4 不显色；样品中 2,4-D 为高度含量时 (>10mg/l)，检测线 1、2、3、4 均不显色，只质控线显色。

实施例 2

采用改良 EDC 法合成 2,4-D 免疫用人工抗原，以 2,4-DB 为半抗原，牛血清白蛋白 (BSA) 为载体蛋白，称取 2,4-DB 60mg，加入 0.05M PB (PH 11 以上)，搅拌使其缓慢溶解，之后调节 PH 值至 7.2 左右，加入 60mg sulf-NHS，充分混合，静置 5min，再加入 90mg EDC，搅匀，静置 5min，该反应液 1 小时内缓慢滴加到 60mg 9ml 的 BSA 溶液中，并 4℃ 下搅拌反应过夜，接着用 0.15M NaCl 液透析 5-6 次，8 小时/次，之后采用紫外光谱吸收法定量测定偶联物的结合比，得到结合比为 1:24 的 2,4-DB—BSA 偶联物，分装冻存于 -20℃ 冰箱中。制备人工抗原过程中，同时进行包被抗原的合成，方法为以 2,4-D 60mg 代替 2,4-DB，按同样方法与 60mg 9ml 的 OVA 溶液反应，合成包被抗原 2,4-D—OVA。

获得的人工抗原 2,4-DB—BSA 免疫新西兰白雄兔，选择体重 1.0-2.0kg 兔采用背部皮下多点注射法进行免疫。按 0.9mg/兔计的 2,4-DB—BSA 人工抗原与等量佛氏完全佐剂充分乳化，加强免疫时用等量佛氏不完全佐剂代替，每次免疫时间间隔为 2 周，共免疫 6 次，最后一次免疫后 10 天采血收集血清，以 ELISA 法测定抗血清效价，待抗血清效价达到要求后，用心脏采血法获取血液，析出抗血清加入 0.01% 硫柳汞，分装后于 -20℃ 冻存。然后用 ELISA 法做抗体效价和抗体亲合性、特异性的测定。

取 700ug 纯化的抗体，边搅拌边加入预先制备的 30nm 大小的胶体金溶液 100ml (PH 8.2) 中，室温搅拌 30min，加 10%BSA 搅 5min，加 10% PEG2000 2ml，搅拌 5min，12000rpm 离心 50min，吸去上清，沉淀即为纯化的金标记抗体。由保存液稀释金标抗体至工作浓度，按 50ul/cm² 的量均匀喷涂于玻璃纤维膜上，并由此确定单位面积上附着金标抗体的量，使其与处理过硝酸纤维素膜上 4 条检测条线包被原的量刚好完全中和。-20℃ 冻存，冷冻真空干燥后，密封保存。将 2,4-DB—OVA 偶联物喷涂于硝酸纤维素膜检测区内的 4 条检测线上，每线宽 0.5cm，点样量 25ul，各条带间隔 2mm，自左至右依次为第 1、2、3、4 线，2,4-D 包被原溶液浓度按 4、3、2、1 的次序递增，点样液浓度依次为 60ng/ml、600ng/ml、6ug/ml、60ug/ml。羊抗兔 IgG1.0mg/ml 喷涂于质控线上。然后将玻璃纤维膜、已固定金标记抗 2,4-D 抗体的玻璃纤维膜、已平行包被 2,4-D—OVA 偶联物和羊抗兔 IgG 抗体的硝酸纤维素膜、吸水垫依次粘贴到双面胶 PVC 板上。用

切条机将其沿纵向切成 5mm×60mm 的试纸条。

测定样品时，将试纸条样品吸收垫插入待测样品中，停留 5 秒后取出平放，5 分钟后观察结果。结果判断方法是通过显示于免疫层析膜上的条纹数量，来判定待检样品中 2,4-D 的含量。当样品中不含 2,4-D 时，玻璃纤维膜上的胶体金-抗 2,4-D 抗体量刚可使硝酸纤维素膜上 4 条检测线显色，质控线也显色；当样品中 2,4-D 为低含量时 (21-100ng/ml)，检测线 1、2、3 和质控线显色、检测线 4 不显色；样品中 2,4-D 为中低含量时 (200-600ng/ml)，检测线 1、2 和质控线显色，第 3、4 条检测线不显色；样品中 2,4-D 为中度含量时(1-6mg/ml)，检测线 1 和质控线显色，检测线 2、3、4 不显色；样品中 2,4-D 为高度含量时(>10mg/l)，检测线 1、2、3、4 均不显色，只质控线显色。

附图说明

图 1 半定量快速检测 2,4-D 胶体金试纸条结构图

图 2 半定量快速检测 2,4-D 胶体金试纸条的主视结构图

图 3 检测显示 2,4-D 阴性结果

图 4 检测显示 2,4-D 低量时 (>21,<200ng/m)

图 5 检测显示 2,4-D 中低含量时 (>200,<1000ng/ml)

图 6 检测显示 2,4-D 中度含量时 (>1000,<5mg/ml)

图 7 检测显示 2,4-D 高度含量时 (>5mg/ml)

图中 1 样品吸收区，2、玻璃纤维素膜，3、金标记抗体区块，4、PVC 板，5、T 测试区 (4 条线)，6、C 质控线，7、硝酸纤维素膜，8、吸水滤纸。

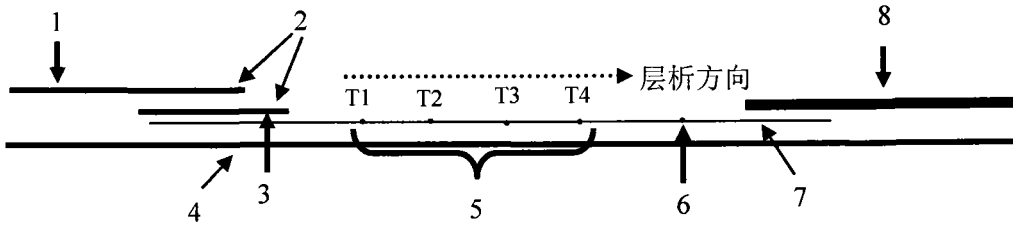


图 1

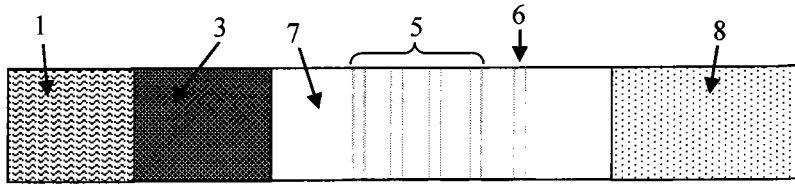


图 2

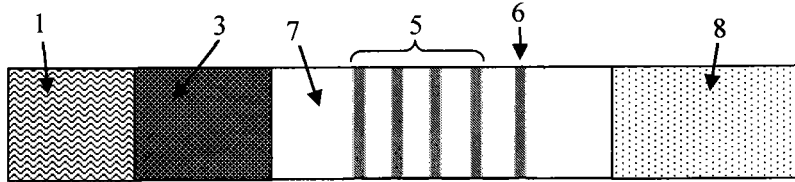


图 3



图 4

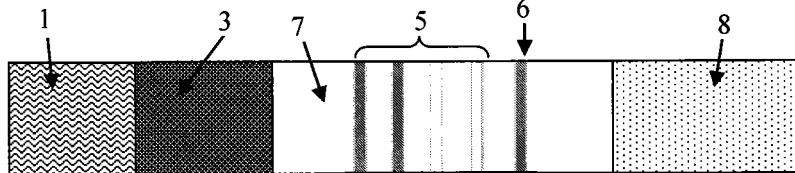


图 5

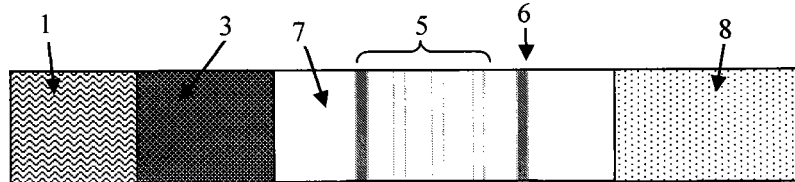


图 6

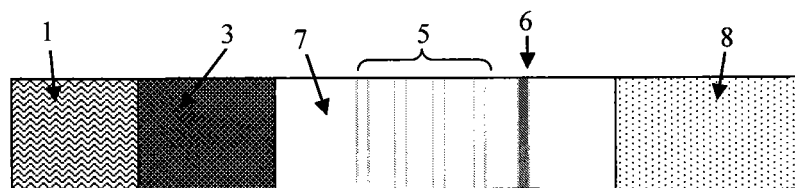


图 7

专利名称(译)	胶体金层析法半定量检测2,4 - D的试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN101158683A	公开(公告)日	2008-04-09
申请号	CN200710105596.1	申请日	2007-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院植物保护研究所		
申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院植物保护研究所		
当前申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院植物保护研究所		
[标]发明人	王升吉 尚佑芬 赵玖华 杨崇良 马立平 崔汉青 路兴波 孙红炜 袁雪英		
发明人	王升吉 尚佑芬 赵玖华 杨崇良 马立平 崔汉青 路兴波 孙红炜 袁雪英		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属免疫化学检测技术，是一种借助胶体金标记显色的免疫层析反应，用以快速半定量检测环境水样中2,4 - D残留量的试纸及制备方法。本发明所依据的原理是通过待检样品中的2,4 - D与精确定量金标抗体反应，然后与呈横条状分布于免疫层析膜上的2,4 - D - OVA发生竞争性的结合，通过显示于免疫层析膜上的条纹数量，来判定待检样品中2,4 - D的含量，条纹数越多，待检样品中2,4 - D的含量越高，对2,4 - D的最小检出量为21ug/l，可在10分钟内完成，具有实质性特点和显著进步，改变了传统的农药残留多步繁琐检测问题，实现一步法快速半定量检测2,4 - D残留的方法。该试纸条由底板、吸水滤纸、硝酸纤维素膜、抗2,4 - D抗体的金标垫、样品吸收垫组成，底板中部为作为实验反应区的硝酸纤维素膜，其上有含4条检测线和一条质控线，最左侧为样品区，底板另一端头为吸水滤纸。

