



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109061146 A

(43)申请公布日 2018. 12. 21

(21)申请号 201811104524.X

G01N 33/58(2006.01)

(22)申请日 2018.09.21

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(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 万宇平 崔海峰
刘惠民 唐纲岭 潘立宁 颜权平
冯才伟

(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 33/558(2006.01)

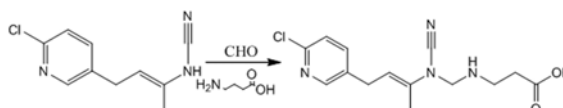
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

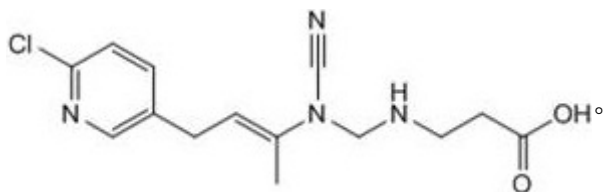
一种检测啮虫脘的试纸条及其制备方法和应用

(57)摘要

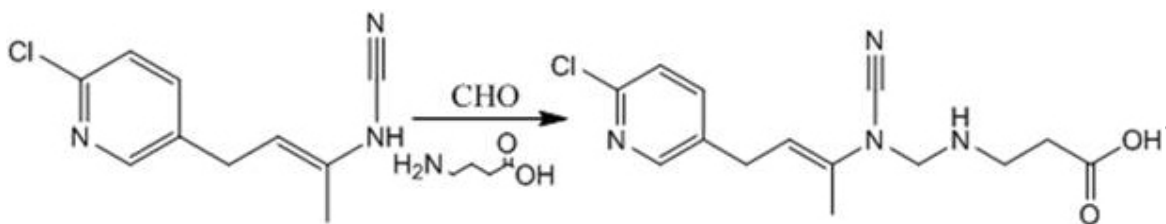
一种检测啮虫脘的试纸条及其制备方法和应用。该试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板；其中反应膜上包被有啮虫脘半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线，结合物释放垫上喷涂有啮虫脘单克隆抗体-胶体金标记物；啮虫脘单克隆抗体是以啮虫脘半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制得，啮虫脘半抗原-载体蛋白偶联物由啮虫脘半抗原与载体蛋白偶联得到，啮虫脘半抗原是由N-去甲啮虫脘与氨基丁酸反应得到。本发明还提供了应用上述试纸条检测样品中啮虫脘的方法。本发明提供的试纸条和检测方法具有操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低、不受检测设备限制的优点，能对大批量样品中的啮虫脘进行快速检测和现场监控。



1. 一种检测啉虫脒的试纸条,包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板,其特征在于:所述反应膜上具有包被有啉虫脒半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线,所述结合物释放垫上喷涂有啉虫脒单克隆抗体-胶体金标记物;所述啉虫脒单克隆抗体是以啉虫脒半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述啉虫脒半抗原-载体蛋白偶联物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所述的试纸条,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所述的试纸条,其特征在于:所述样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次粘贴在底板上。

4. 如权利要求1或3所述的试纸条,其特征在于:所述结合物释放垫1/3~1/2被覆盖于样品吸收垫下。

5. 如权利要求1所述的试纸条,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。

6. 如权利要求1所述的试纸条,其特征在于:所述羊抗鼠抗抗体是以鼠源抗体为免疫原对山羊进行免疫制备获得。

7. 一种制备权利要求1-6任一项所述试纸条的方法,其特征在于:该方法包括以下步骤:

- 1) 制备喷涂有啉虫脒单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;
- 2) 制备具有包被有啉虫脒半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线的反应膜;
- 3) 将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和底板组装成试纸条。

8. 一种应用权利要求1-6所述试纸条检测样品中啉虫脒的方法,其特征在于:包括以下步骤:

- 1) 对样品进行前处理;
- 2) 用所述试纸条进行检测;
- 3) 分析检测结果。

一种检测啉虫脒的试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测啉虫脒的试纸条及其制备方法和应用,具体涉及一种用于检测啉虫脒的胶体金试纸条,其特别适用于烟草中啉虫脒的快速检测。

背景技术

[0002] 啉虫脒(acetamiprid)属于新烟碱类杀虫剂,新烟碱类杀虫剂是继有机磷、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。啉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。啉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》中规定啉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啉虫脒的最大残留限量,国际烟草科学研究合作中心(CORESTA)规定烟草中啉虫脒的指导性残留限量为3 mg/kg。因此,为避免啉虫脒残留对人体造成危害以及突破国外贸易壁垒,建立简单、快速、准确、可靠的啉虫脒残留量的检测方法很有必要。

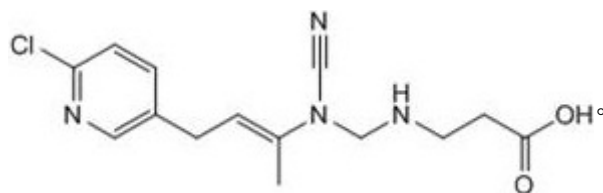
[0003] 目前,有关啉虫脒残留分析的研究主要集中于气相色谱、液相色谱及气相色谱-质谱联用技术、液相色谱-质谱联用技术。仪器分析方法虽可以实现准确定性定量,但需要复杂昂贵的仪器设备及专业操作人员,加之样品前处理繁琐费时、检测时间长、检测费用高,对于现场检测工作的开展具有局限性。因此,开发一种不受检测设备限制并且能够实现对大批量样品进行快速检测的产品和方法成为迫切需要解决的问题。

发明内容

[0004] 本发明的目的正是基于上述现有技术状况,提供一种操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低、不受检测设备限制的试纸条,以实现大批量的啉虫脒样品进行快速检测和现场监控。

[0005] 为了实现本发明的目的,本发明提供了一种检测啉虫脒的试纸条,该试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板;其中,所述反应膜上具有包被有啉虫脒半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线,所述结合物释放垫上喷涂有啉虫脒单克隆抗体-胶体金标记物。

[0006] 所述啉虫脒单克隆抗体是以啉虫脒半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述啉虫脒半抗原-载体蛋白偶联物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:



[0007] 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。

[0008] 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。

[0009] 所述羊抗鼠抗抗体是以鼠源抗体为免疫原对山羊进行免疫制备获得。

[0010] 所述样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次粘贴在底板上，所述结合物释放垫1/3~1/2被覆盖于样品吸收垫下。

[0011] 所述底板为PVC底板或其他硬质不吸水的材料；所述样品吸收垫为吸滤纸或滤油纸；所述结合物释放垫为玻璃棉或聚酯材料；所述吸水垫为吸水纸；所述反应膜为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜。

[0012] 本发明的另一个目的是提供一种制备上述试纸条的方法，该方法包括以下步骤：

- 1) 制备喷涂有啉虫脒单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫；
- 2) 制备具有包被有啉虫脒半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线的反应膜；
- 3) 将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和底板组装成试纸条。

[0013] 具体地说，步骤包括：

- 1) 将N-去甲啉虫脒与氨基丁酸反应，制备啉虫脒半抗原；
- 2) 将啉虫脒半抗原与载体蛋白偶联，制备啉虫脒半抗原-载体蛋白偶联物；
- 3) 用啉虫脒半抗原-载体蛋白偶联物免疫小鼠，将小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞通过融合、筛选，得到分泌啉虫脒单克隆抗体的杂交瘤细胞株；
- 4) 提取小鼠IgG免疫健康山羊，得到羊抗鼠抗抗体；
- 5) 分别将啉虫脒半抗原-载体蛋白偶联物和羊抗鼠抗抗体包被于反应膜的检测线(T)和质控线(C)上；
- 6) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金；
- 7) 将制备的啉虫脒单克隆抗体加入到制备的胶体金中，得到啉虫脒单克隆抗体-胶体金标记物；
- 8) 将啉虫脒单克隆抗体-胶体金标记物喷涂在结合物释放垫上，37℃烘1h后取出，置于干燥环境中保存备用；
- 9) 将样品吸收垫用含0.5%牛血清白蛋白(质量分数)、pH值为7.2的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液浸泡2h，37℃下烘干2h；
- 10) 在底板上按顺序粘贴上样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫，结合物释放垫从起始端有1/3区域被样品吸收垫覆盖。最后切成3 mm宽的小条，加塑料盒，真空包装，4~30

℃条件下可保存12个月。结合物释放垫的1/3被样品吸收垫覆盖可以延长检测结果观察时间,可使样品吸收垫将检测液体充分吸收并与金标抗体充分反应,从而减少误差。

[0014] 本发明的另一个目的是提供一种应用上述试纸条检测样品中啉虫脒的方法,该方法包括如下步骤:

- (1) 对样品进行前处理;
- (2) 用试纸条进行检测;
- (3) 分析检测结果。

[0015] 本发明的检测啉虫脒的试纸条采用高度特异性的抗体抗原反应及免疫层析分析技术,将啉虫脒单克隆抗体-胶体金标记物固定于结合物释放垫上,样品中的啉虫脒在流动过程中,与结合物释放垫上的啉虫脒单克隆抗体-胶体金标记物结合,形成啉虫脒-抗体-胶体金标记物。样本中的啉虫脒与反应膜检测线上的啉虫脒半抗原-载体蛋白偶联物竞争结合啉虫脒单克隆抗体-胶体金标记物,根据检测线红色条带深浅来判断待测样品液中是否含有啉虫脒残留。

[0016] 检测时,样品经处理后滴入试纸条卡孔内,当啉虫脒在样品中的浓度低于检测限或为零时,单克隆抗体-胶体金标记物在层析过程中会与固定在反应膜上的啉虫脒半抗原-载体蛋白偶联物结合,在检测线(T)和质控线(C)处各出现一条红色条带,且T线显色比C线显色深或与C线显色一致;如果啉虫脒在样品中的浓度等于或高于检测限,单克隆抗体-胶体金标记物会与啉虫脒全部结合,从而在T线处因为竞争反应不会与啉虫脒半抗原-载体蛋白偶联物结合而不出现红色条带或比C线显色浅。如图2所示。

[0017] 阴性:当质控线(C)显示出红色条带,检测线(T)同时也显示出红色条带,且T线颜色接近或深于C线时,判为阴性。

[0018] 阳性:当质控线(C)显示出红色条带,而检测线(T)不显色或T线颜色浅于C线时,判为阳性。

[0019] 无效:当质控线(C)不显示出红色条带,则无论检测线(T)显示出红色条带与否,该试纸条均判为无效。

[0020] 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纸条具有灵敏度高、特异性强的特点。同时本发明的试纸条具有成本低、操作简单、检测时间短、不受检测设备限制、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点。综上,用本发明试纸条检测啉虫脒的方法,简便、快速、直观、准确、适用范围广、成本低、易推广使用。。

附图说明

[0021] 图1为试纸条剖面结构示意图,图中:1、样品吸收垫;2、结合物释放垫;3、反应膜;4、吸水垫;5、检测线;6、质控线;7、底板;

图2为试纸条检测结果判定图;

图3为啉虫脒半抗原合成图(该图作为摘要附图)。

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发明的保护范围。

[0023] 实施例1 检测啮虫脘的试纸条的制备

该试纸条的制备方法主要包括以下步骤:

- 1) 制备喷涂有啮虫脘单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;
- 2) 制备具有包被有啮虫脘半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线的反应膜;
- 3) 将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和PVC底板组装成试纸条。

[0024] 下面分步详细叙述:

1、啮虫脘半抗原的合成及鉴定

取N-去甲啮虫脘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啮虫脘0.69 g,收率92.81%。

[0025] 取上述半抗原经核磁共振氢谱鉴定,¹H NMR(CDCl₃, 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。

[0026] 2、啮虫脘偶联抗原的合成及鉴定

免疫原制备——啮虫脘半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

[0027] 取半抗原羧基啮虫脘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1h,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5h,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。

[0028] 包被原制备——啮虫脘半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0029] 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1h,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5h,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。

[0030] 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。

[0031] 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:将啉虫脒半抗原-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,用弗氏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啉虫脒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。

[0032] (2) 单克隆抗体的制备

1) 细胞复苏:取出啉虫脒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,得到啉虫脒单克隆抗体溶液(-20℃保存)。

[0033] (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)。

[0034] 间接竞争ELISA方法:用啉虫脒半抗原-OVA偶联物包被酶标板,加入啉虫脒标准品溶液、啉虫脒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。

[0035] (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。

[0036] 本实验将烟碱类杀虫剂(啉虫脒、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 IC_{50} ,然后按下式计算交叉反应率:

交叉反应率 (%) =	引起 50%抑制的啉虫脒浓度	×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:啉虫脒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,只针对啉虫脒有特异性结合。

[0037] 4、羊抗鼠抗抗体的制备

以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体。

[0038] 5、啉虫脒单克隆抗体-胶体金标记物的制备

(1) 胶体金的制备

用双蒸去离子水将质量分数为1%的氯金酸溶液稀释成0.01%,取100 mL置于锥形瓶中,

用恒温电磁搅拌器加热至沸腾,在持续高温、持续搅拌下加入1.5 mL质量分数为1%的柠檬酸三钠溶液,继续匀速搅拌加热至溶液呈透亮的酒红色时停止,冷却至室温后用去离子水恢复到原体积,4℃保存。制备良好的胶体金用肉眼观察是清亮透明的,没有混浊,液体表面无漂浮物,在日光下观察胶体金的颜色为酒红色。

[0039] (2) 啮虫脘单克隆抗体-胶体金标记物的制备

在磁力搅拌下,用0.2 mol/L碳酸钾溶液调节胶体金的pH值至7.2(不同抗体的pH值标记范围在7~8之间,可以变化),按每毫升胶体金溶液中加入20~50 μg抗体的标准向胶体金溶液中加入上述啮虫脘单克隆抗体,搅拌混匀,室温静置10 min,加入10% BSA使其在胶体金溶液中的终质量分数为1%,静置10 min。12000 r/min,4℃离心40 min,弃上清液,沉淀用复溶缓冲液洗涤两次,用体积为初始胶体金体积1/10的复溶缓冲液将沉淀重悬,置4℃备用。

[0040] 复溶缓冲液:含BSA的质量分数为0.1%~0.3%、吐温-80的质量分数为0.05%~0.2%、pH值为7.2的0.02 mol/L磷酸盐缓冲液。

[0041] 6、结合物释放垫的制备

将结合物释放垫浸泡于含0.5% BSA(质量分数)、pH值为7.2的0.5 mol/L磷酸盐缓冲液中,均匀浸湿1h,37℃烘3h备用。用Isoflow喷膜仪将制备好的啮虫脘单克隆抗体-胶体金标记物均匀喷涂在结合物释放垫上,每1 cm结合物释放垫喷涂0.01 mL啮虫脘单克隆抗体-胶体金标记物后,置于37℃环境中(湿度<20%)60 min后取出,置于干燥环境(湿度<20%)中保存备用。

[0042] 7、反应膜的制备

将啮虫脘半抗原-卵清蛋白偶联物包被到反应膜上构成检测线,将羊抗鼠抗抗体包被在反应膜上构成质控线。

[0043] 包被过程:用磷酸缓冲液将啮虫脘半抗原-卵清蛋白偶联物稀释到1 mg/mL,用Isoflow点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测线(T),包被量为1.0 μL/cm;用0.01 mol/L、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释到200 μg/mL,用Isoflow点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的质控线(C),包被量为1.0 μL/cm。将包被好的反应膜置于37℃条件下干燥2h,备用。

[0044] 8、样品吸收垫的制备

将样品吸收垫用含0.5%牛血清白蛋白(质量分数)、pH值为7.2的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液浸泡2h,37℃下烘干2h备用。

[0045] 9、试纸条的组装

将样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次按顺序粘贴在PVC底板上;结合物释放垫从起始端有1/3区域被样品吸收垫覆盖,结合物释放垫的末端与反应膜的始端连接,反应膜的末端与吸水垫的始端相连,样品吸收垫的始端与PVC底板的始端对齐,吸水垫的末端与PVC底板的末端对齐;所述反应膜上有检测线和质控线,检测线(T)和质控线(C)均呈与所述试纸条的长相垂直的条状带;检测线位于靠近结合物释放垫的末端的一侧;质控线位于远离结合物释放垫的末端的一侧;将试纸条用机器切成3 mm宽的小条,装在特制的塑料制卡中,4~30℃条件下可保存12个月。

[0046] 实施例2 样品中啮虫脘的检测

1、样品的前处理

称取 $1.0\text{g} \pm 0.05\text{ g}$ 粉碎的烟叶样本至聚苯乙烯离心管中；加入5 mL 50%甲醇水溶液，用匀浆机将其充分打碎，得样本液；移取100 μL 样本液与900 μL PBS缓冲液混匀后待检。

[0047] 2、用试纸条进行检测

用移液器取待检样本溶液70 μL 垂直滴于加样孔中，液体流动时开始计时，反应10 min，判定结果。

[0048] 3、分析检测结果

阴性(-)：T线显色比C线显色深或与C线显色一致，表示样品中啮虫脒浓度低于检测限，如图2a、2b。

[0049] 阳性(+)：T线显色比C线显色浅或T线不显色，表示样品中啮虫脒浓度等于或高于检测限，如图2c、2d。

[0050] 无效：未出现C线，表明不正确的操作过程或试纸条已变质失效，如图2e、2f。在此情况下，应再次仔细阅读说明书，并用新的试纸条重新测试。

[0051] 实施例3 样品检测实例

1、检测限试验

取空白烟叶样品，在其中分别添加啮虫脒至终浓度为1.5、3、6 mg/kg，取试纸条进行检测，每个样本重复测定三次。

[0052] 用试纸条检测烟叶样品时，当其中啮虫脒添加浓度为1.5 mg/kg时，试纸条上显示出T线显色比C线显色深或与C线显色一致，呈阴性；当其中啮虫脒添加浓度为3、6 mg/kg时，试纸条上显示出T线显色比C线显色浅或T线不显色，呈阳性，表明本试纸条对烟叶中啮虫脒的检测限为3 mg/kg。

[0053] 2、假阳性率、假阴性率试验

取已知啮虫脒含量大于3 mg/kg的阳性烟叶样品20份，已知不含啮虫脒的阴性烟叶样品20份，用三批试纸条进行检测，计算其阴阳性率。

[0054] 结果表明：用3个批次生产的试纸条检测阳性样品时，结果全为阳性，可知阳性样品符合率为100%，假阴性率为0；检测阴性样品时，结果全为阴性，可知阴性样品符合率为100%，假阳性率为0。说明本发明的检测啮虫脒的试纸条可以对烟叶中的啮虫脒进行快速检测。

[0055] 3、特异性试验

将吡虫啉、烯啶虫胺、噻虫啉、噻虫嗪、噻虫胺、呋虫胺等用pH值为7.2、0.2 mol/L的磷酸盐缓冲液稀释至100 mg/L，用啮虫脒试纸条进行检测。结果显示，用该试纸条检测100 mg/L吡虫啉、烯啶虫胺、噻虫啉、噻虫嗪、噻虫胺、呋虫胺时，试纸条T线显色比C线显色深或与C线显色一致，呈阴性。说明本试纸条对吡虫啉、烯啶虫胺、噻虫啉、噻虫嗪、噻虫胺、呋虫胺无交叉反应。

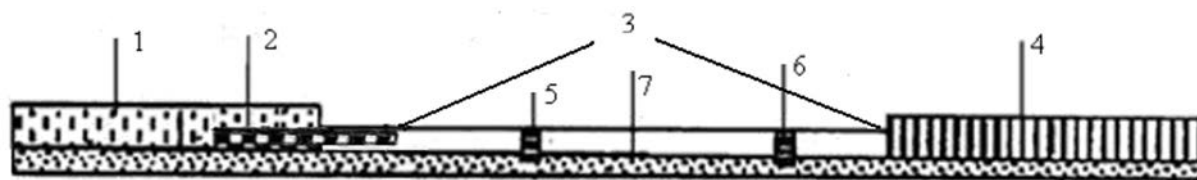


图1

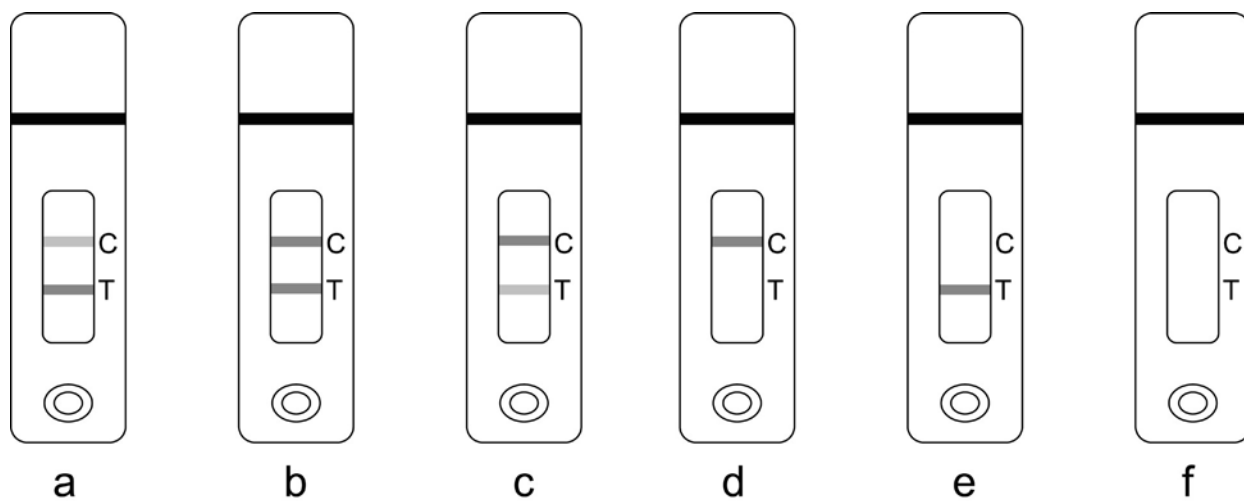


图2

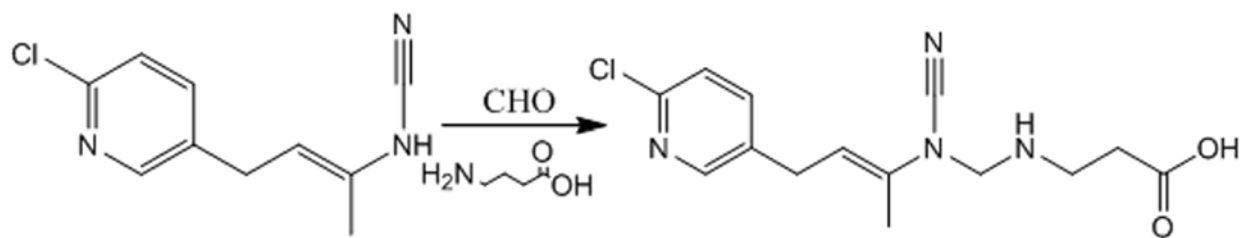


图3

专利名称(译)	一种检测啮虫脘的试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109061146A	公开(公告)日	2018-12-21
申请号	CN201811104524.X	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 万宇平 崔海峰 刘惠民 唐纲岭 潘立宁 颜权平 冯才伟		
发明人	范子彦 陈黎 万宇平 崔海峰 刘惠民 唐纲岭 潘立宁 颜权平 冯才伟		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/58 G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N33/577 G01N33/58		
代理人(译)	姜振东		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测啮虫脘的试纸条及其制备方法和应用。该试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板；其中反应膜上包被有啮虫脘半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线，结合物释放垫上喷涂有啮虫脘单克隆抗体-胶体金标记物；啮虫脘单克隆抗体是以啮虫脘半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制得，啮虫脘半抗原-载体蛋白偶联物由啮虫脘半抗原与载体蛋白偶联得到，啮虫脘半抗原是由N-去甲啮虫脘与氨基丁酸反应得到。本发明还提供了应用上述试纸条检测样品中啮虫脘的方法。本发明提供的试纸条和检测方法具有操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低、不受检测设备限制的优点，能对大批量样品中的啮虫脘进行快速检测和现场监控。

