



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105486872 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 13

(21) 申请号 201510973179. 3

G01N 33/531(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 12. 23

(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 崔海峰 张瑜
潘立宁 胡斌 唐纲岭 刘惠民
罗晓琴

(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 33/577(2006. 01)

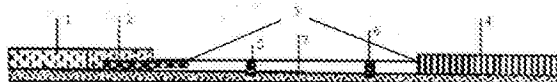
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测三唑醇的试纸条及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供一种检测三唑醇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;其特征在于:所述反应膜上具有包被有三唑醇半抗原-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三唑醇单克隆抗体-胶体金标记物。本发明还提供一种应用上述试纸条检测样品中三唑醇的方法。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,能够实现对大批量的三唑醇样品进行快速检测和现场监控。

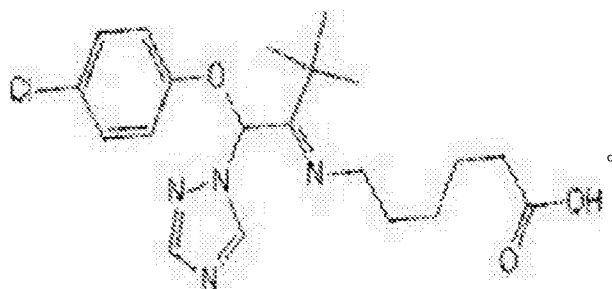


1. 一种检测三唑醇的试纸条,包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板;其特征在于:所述反应膜上具有包被有三唑醇半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线,所述结合物释放垫上喷涂有三唑醇单克隆抗体-胶体金标记物。

2. 根据权利要求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,且结合物释放垫1/3~1/2被覆盖于样品吸收垫下。

3. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于,所述三唑醇半抗原-载体蛋白偶联物由三唑醇半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白、兔血清白蛋白。

4. 根据权利要求1或3所述的试纸条,其特征在于,所述三唑醇半抗原是由三唑酮与氨基己酸在有机碱1,8-二氮杂二环十一碳-7-烯的催化下进行酮胺的缩合反应得到,其分子结构式为:



5. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于,所述三唑醇单克隆抗体是以三唑醇半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得。

6. 根据权利要求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,包括以下步骤:

1) 制备喷涂有三唑醇单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

2) 制备具有包被有三唑醇半抗原-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任一所述试纸条检测烟叶样品中三唑醇的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

1) 对样品进行前处理;

2) 用权利要求1-6任一项所述的试纸条进行检测;

3) 分析检测结果。

一种检测三唑醇的试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及三唑醇的检测,具体是一种用于检测三唑醇的胶体金试纸条,其特别适用于烟液中三唑醇残留的检测。

背景技术

[0002] 三唑醇(triadimenol, $C_{14}H_{18}CN_3O_2$)又名百担,化学名称为1-(4-氯苯氧基)-3,3-二甲基-1-(1H-1,2,4-三唑-1-基)-2-丁醇,是一种低毒、广谱、高效的内吸性杀菌剂,其主要作用机理是抑制赤霉素和麦角固醇的生物合成进而影响细胞分裂速率,对烟草根黑腐病、白粉病、蛙眼病等真菌病害都有很好的防治效果。因此,在我国农业生产中的应用非常广泛,适用于麦类、玉米、高粱、果蔬、烟草等农作物。

[0003] 烟草中三唑醇残留是国际烟草科学研究合作中心(CORESTA)密切关注的,且近年来在我国某些产地烟草中的检出率也较高。随着三唑醇的广泛使用和人们对食品和农作物安全的重视,三唑醇在食品及农作物中的残留也受到了高度关注。2007年1月欧盟公布了进口的中国产蜂蜜中检测出三唑醇残留量超标的预警通报。同年5月,日本厚生劳动省查出我国1批输日胡萝卜中三唑醇残留量超标,由此日方要求对我国出口日本的胡萝卜中三唑醇项目实施50%监控检查。目前,很多国家已明确限定该农药在食品中的最高残留限量,如日本规定三唑醇在食品中的残留限量(MRL)为0.2~0.5 mg/kg;欧盟规定三唑醇在豆类中的MRL为0.1 mg/kg;国际食品法典委员会(CAC)规定西红柿中三唑醇的MRL为0.5 mg/kg。为避免三唑醇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、可靠的烟草中三唑醇类残留量的检测方法很有必要。

[0004] 目前常用的三唑醇检测方法主要有气相色谱法(GC)、液相色谱法(LC)、气-质联用法(GC-MS)和液-质联用法(LC-MS)。采用这些分析方法需要昂贵的仪器和专门的技术人员,样品前处理过程复杂且花费高、费时长,难以满足大量样品和现场样品快速检测的需要。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。

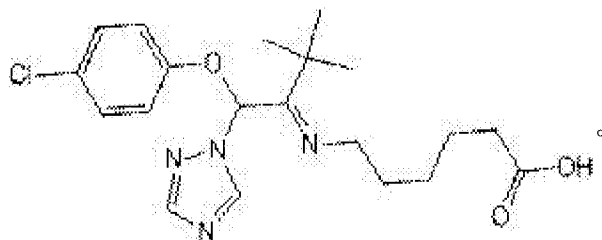
发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有的检测三唑醇的方法存在的对设备依赖性高,并且不能够实现对大批量样品的快速检测的特点,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及其制备方法和应用,以实现大批量的三唑醇样品进行快速检测和现场监控。

[0006] 为了实现本发明的目的,本发明提供了一种检测三唑醇的试纸条,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三唑醇半抗原-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三唑醇单克隆抗体-胶体金标记物。

[0007] 所述三唑醇半抗原-载体蛋白偶联物由三唑醇半抗原与载体蛋白偶联得到,所述

载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白,所述三唑醇半抗原是由三唑酮与氨基己酸在有机碱1,8-二氮杂二环十一碳-7-烯的催化下进行酮胺的缩合反应得到,其分子结构式为:



[0008] 所述三唑醇单克隆抗体是以三唑醇半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,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。

[0009] 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。

[0010] 所述底板可为PVC底板或其他硬质不吸水的材料;所述样品吸收垫可为吸滤纸或滤油纸;所述结合物释放垫可为玻璃棉或聚酯材料;所述吸水垫为吸水纸;所述反应膜可为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜。

[0011] 一种制备上述试纸条的方法,包括以下步骤:

- 1)制备喷涂有三唑醇单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;
- 2)制备具有包被有三唑醇半抗原-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。

[0012] 具体地说,步骤包括:

- 1)将三唑酮与氨基己酸在有机碱1,8-二氮杂二环十一碳-7-烯的催化下进行酮胺的缩合反应,制备三唑醇半抗原;
- 2)将三唑醇半抗原与载体蛋白偶联,制备三唑醇半抗原-载体蛋白偶联物;
- 3)用三唑醇半抗原-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,得到分泌三唑醇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)分别将三唑醇半抗原-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)将制备的三唑醇单克隆抗体加入到制备的胶体金中,得到三唑醇单克隆抗体-胶体金标记物;
- 8)将三唑醇单克隆抗体-胶体金标记物喷涂在结合物释放垫上,37℃烘1 h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 7.2的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液浸泡2 h,37℃下烘干2 h;
- 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。

[0013] 应用上述试纸条检测样品中三唑醇的方法,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。

[0014] 本发明的检测三唑醇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,将三唑醇单克隆抗体-胶体金标记物固定于结合物释放垫上,样品中的三唑醇在流动过程中,与结合物释放垫上的三唑醇单克隆抗体-胶体金标记物结合,形成三唑醇-抗体-胶体金标记物。样本中的三唑醇与反应膜检测线上的三唑醇半抗原-载体蛋白偶联物竞争结合三唑醇单克隆抗体-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三唑醇残留。

[0015] 检测时,样品经处理后滴入样品吸收垫,当三唑醇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三唑醇半抗原-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;如果三唑醇在样品中的浓度等于或高于检测限,单克隆抗体-胶体金标记物会与三唑醇全部结合,从而在T线处因为竞争反应不会与三唑醇半抗原-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。

[0016] 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。

[0017] 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。

[0018] 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。

[0019] 本发明的试纸条具有灵敏度高、特异性强、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。用本发明试纸条检测三唑醇的方法,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

[0020] 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为三唑醇半抗原合成图。

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。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。

[0022] 实施例1 检测三唑醇的试纸条的制备

该试纸条的制备方法主要包括以下步骤：

1)制备喷涂有三唑醇单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫；

2)制备具有包被有三唑醇半抗原-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。

[0023] 下面分步详细叙述：

1、三唑醇半抗原的合成(合成路线见附图3)及鉴定

取1.0 g三唑酮加乙醇溶解,加入0.35 g 1,8-二氮杂二环十一碳-7-烯(DBU),搅拌,再加入0.87 g氨基己酸水溶液,加热回流反应12 h;停止反应,旋蒸,除去乙醇,加水和1.3 g氢氧化钾,震荡,加乙酸乙酯萃取,分去有机相,水相调节pH值到4,加乙酸乙酯萃取,有机相水洗,无水硫酸钠干燥蒸干,得到浅黄色油状物,二氯甲烷/石油醚(1:10,V/V)重结晶,得到半抗原产物0.76 g,收率69%。

[0024] 取上述半抗原经核磁共振氢谱鉴定, $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 300\text{MHz})\delta:11.00(1\text{H}, \text{s}), 7.51(1\text{H}, \text{ddd}, J=8.132, J=5.483, J=1.670), 7.46(1\text{H}, \text{ddd}, J=8.132, J=5.485, J=1.670), 6.94(1\text{H}, \text{dd}, J=8.132, J=5.485), 6.94(1\text{H}, \text{dd}, J=8.132, J=5.483), 6.52(1\text{H}), 8.270(1\text{H}, \text{d}, J=1.903), 8.1(1\text{H}, \text{d}, J=1.903), 3.87(2\text{H}, \text{t}, J=7.434), 1.25(3\text{H}, \text{s}), 1.25(3\text{H}, \text{s}), 1.25(3\text{H}, \text{s}), 1.84(2\text{H}, \text{tt}, J=7.434, J=7.022), 1.41(2\text{H}, \text{tt}, J=7.434, J=7.022), 1.55(2\text{H}, \text{tt}, J=7.434, J=7.367), 2.30(2\text{H}, \text{t}, J=7.367)$ 。图谱中化学位移 $\delta=11.0$ 的为间隔臂上羧基氢共振吸收峰, $\delta=1.85、1.41、2.30$ 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,三唑醇半抗原结构正确。

[0025] 2、三唑醇偶联抗原的合成及鉴定

免疫抗原制备——三唑醇半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫抗原。

[0026] 取14 mg半抗原,溶解于1 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中;称取BSA 50 mg,使之充分溶解在3.8 mL 2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液(MES)(pH 5.0)中,将半抗原缓慢滴加到蛋白溶液中;取30 mg碳化二亚胺(EDC)用0.2 mL MES(pH5.0)充分溶解后加入半抗原蛋白混合液中,室温下搅拌24 h;用0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)4℃透析3 d,每天换3次透析液;分装,于-20℃保存备用。

[0027] 三唑醇半抗原与血蓝蛋白偶联得到免疫原。

[0028] 称取血蓝蛋白50 mg,使之充分溶解在3.8 mL 0.1M的磷酸盐缓冲液PBS(PH 7.2)中,得到溶液A;取30 mg碳化二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)用0.2 mL水充分溶解后加入溶液A中,室温下搅拌30 min。取6 mg半抗原,溶解于1 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,然后缓慢加入到蛋白溶解中,室温搅拌反应24 h。用0.01 mol/L PBS 4℃透析3 d每天换3次透析液。分装,于-20℃保存备用。

[0029] 三唑醇半抗原与甲状腺蛋白偶联得到免疫原。

[0030] 称取甲状腺蛋白50 mg,使之充分溶解在3.8 mL 0.1M的磷酸盐缓冲液PBS(PH 7.2)中,得到溶液A;取30 mg碳化二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)用0.2 mL水充分溶解后加入溶液A中,室温下搅拌30 min。取8mg半抗原,溶解于1 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,然后缓慢加入到蛋白溶解中,室温搅拌反应24 h。用0.01 mol/L PBS 4℃透析3 d

每天换3次透析液。分装,于-20℃保存备用。

[0031]

包被抗原制备——三唑醇半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被抗原。

[0032] 取14 mg半抗原,溶解于1 mL DMF中;称取OVA 50 mg,使之充分溶解在3.8 mL MES (pH 5.0)中,将半抗原缓慢滴加到蛋白溶液中;取30 mg EDC用 0.2 mL MES(pH5.0)充分溶解后加入半抗原蛋白混合液中,室温下搅拌24 h;用0.01 mol/L PBS 4℃透析3 d,每天换3次透析液;分装,于-20℃保存备用。

[0033] 三唑醇半抗原与人血清白蛋白偶联得到包被原

称取人血清白蛋白50 mg,使之充分溶解在3.8 mL 0.1M PBS(PH 7.2)中,得到溶液B;取30mg EDC和NHS用0.2 mL水充分溶解后于加入溶液B中,室温下搅拌30 min。取14mg半抗原,溶解于1mL DMF中,然后缓慢加入到蛋白溶解中,室温搅拌反应24 h。用0.01 mol/L PBS 4℃透析3 d每天换3次透析液。分装,于-20℃保存备用。

[0034] 三唑醇半抗原与兔血清白蛋白偶联得到包被原

称取兔血清白蛋白50 mg,使之充分溶解在3.8 mL 0.1M PBS(PH 7.2)中,得到溶液B;取30mg EDC和NHS用0.2 mL水充分溶解后于加入溶液B中,室温下搅拌30 min。取14mg半抗原,溶解于1mL DMF中,然后缓慢加入到蛋白溶解中,室温搅拌反应24 h。用0.01 mol/L PBS 4℃透析3 d每天换3次透析液。分装,于-20℃保存备用。

[0035]

按合成三唑醇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 ~ 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。偶联物三唑醇半抗原-载体蛋白的最大吸收峰与三唑醇半抗原、载体蛋白的最大吸收峰相比发生了明显的变化,表明三唑醇半抗原-载体蛋白的合成是成功的。经计算,半抗原与BSA的结合比为13:1,与OVA的结合比为8:1。

[0036] 3、三唑醇单克隆抗体的制备

(1)杂交瘤细胞的获得

1)首次免疫:将三唑醇半抗原-BSA偶联物(免疫抗原)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三唑醇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。

[0037] (2)单克隆抗体的制备

1)细胞复苏:取出三唑醇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,得到三唑醇单克隆抗体溶液(-20°C 保存)。

[0038] (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)。

[0039] 间接竞争ELISA方法:用三唑醇半抗原-OVA偶联物包被酶标板,加入三唑醇标准品溶液、三唑醇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°C 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°C 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。

[0040] (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。

[0041] 本实验将三唑醇类杀菌剂(三唑醇、环唑醇、粉唑醇、戊唑醇、己唑醇、烯唑醇、联苯三唑醇)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%抑制的三唑醇浓度	×100%
	引起 50%抑制的其他三唑醇类杀菌剂浓度	

结果显示各类似物的交叉反应率为:三唑醇100%、环唑醇 $<1\%$ 、粉唑醇 $<1\%$ 、戊唑醇 $<1\%$ 、己唑醇 $<1\%$ 、烯唑醇 $<1\%$ 、联苯三唑醇 $<1\%$ 。本发明抗体对环唑醇、粉唑醇、戊唑醇、己唑醇、烯唑醇、联苯三唑醇等其他三唑醇类杀虫剂无交叉反应,只针对三唑醇有特异性结合。

[0042] 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。

[0043] 5、三唑醇单克隆抗体-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°C 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。

[0044] (2)三唑醇单克隆抗体-胶体金标记物的制备

在磁力搅拌下,用0.2 mol/L碳酸钾溶液调胶体金的pH至7.2(不同抗体的pH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三唑醇单克隆抗体,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°C 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°C 备用。

[0045] 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%、pH7.2的0.02 mol/L磷酸盐缓冲液。

[0046] 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 7.2的0.5 mol/L磷酸盐缓冲液中,

均匀浸湿1 h, 37℃烘3 h备用。用Isoflow喷膜仪将制备好的三唑醇单克隆抗体-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三唑醇单克隆抗体-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。

[0047] 7、反应膜的制备

将三唑醇半抗原-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。

[0048] 包被过程: 用磷酸缓冲液将三唑醇半抗原-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、pH7.4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2 h, 备用。

[0049] 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 7.2的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液浸泡2 h, 37℃下烘干2h备用。

[0050] 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。

[0051] 实施例2 样品中三唑醇的检测

1、样品的前处理

称取 1.0 ± 0.05 g粉碎的烟叶样本至聚苯乙烯离心管中; 加入10 mL 50%甲醇溶液, 用匀浆机将其充分打碎, 得样本液; 移取50 μL样本液与575 μL去离子水(干烟草)或100 μL样本液与650 μL去离子水(湿烟草)混匀后待检。

[0052] 2、用试纸条进行检测

用移液器取待检样本溶液100 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。

[0053] 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, 表示样品中三唑醇浓度低于检测限, 如图2a、2b。

[0054] 阳性(+): T线显色比C线显色浅或T线不显色, 表示样品中三唑醇浓度等于或高于检测限, 如图2c、2d。

[0055] 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。

[0056] 实施例3 样品检测实例

1、检测限试验

取空白烟叶样品,在其中分别添加三唑醇至终浓度为干烟草2.5、5、10 mg/kg,湿烟草1.5、3、6 mg/kg,取试纸条进行检测,每个样本重复测定三次。

[0057] 用试纸条检测烟叶样品时,当其中三唑醇添加浓度为干烟草2.5 mg/kg、湿烟草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;当其中三唑醇添加浓度为干烟草5、10 mg/kg,湿烟草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三唑醇的检测限为干烟草5 mg/kg、湿烟草3 mg/kg。

[0058] 2、假阳性率、假阴性率试验

取已知三唑醇含量大于5 mg/kg的干烟草阳性样品和含量大于3 mg/kg的湿烟草阳性样品各20份,已知三唑醇含量小于5 mg/kg的干烟草阴性样品和含量小于3 mg/kg的湿烟草阴性样品各20份,用三批试纸条进行检测,计算其阴阳性率。

[0059] 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。说明本发明的检测三唑醇的试纸条可以对烟叶中的三唑醇进行快速检测。

[0060] 3、特异性试验

将环唑醇、粉唑醇、戊唑醇、己唑醇、烯唑醇、联苯三唑醇等用pH7.2、0.2 mol/L的磷酸盐缓冲液稀释至5 mg/L,用三唑醇试纸条进行检测。结果显示,用该试纸条检测5mg/L环唑醇、粉唑醇、戊唑醇、己唑醇、烯唑醇、联苯三唑醇时,试纸条T线显色比C线显色深或与C线显色一致,呈阴性。说明本试纸条对环唑醇、粉唑醇、戊唑醇、己唑醇、烯唑醇、联苯三唑醇无交叉反应。

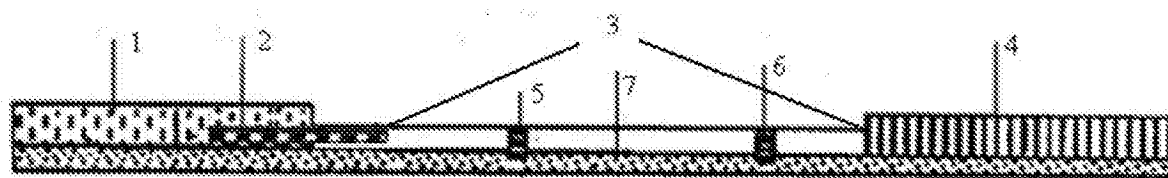


图1

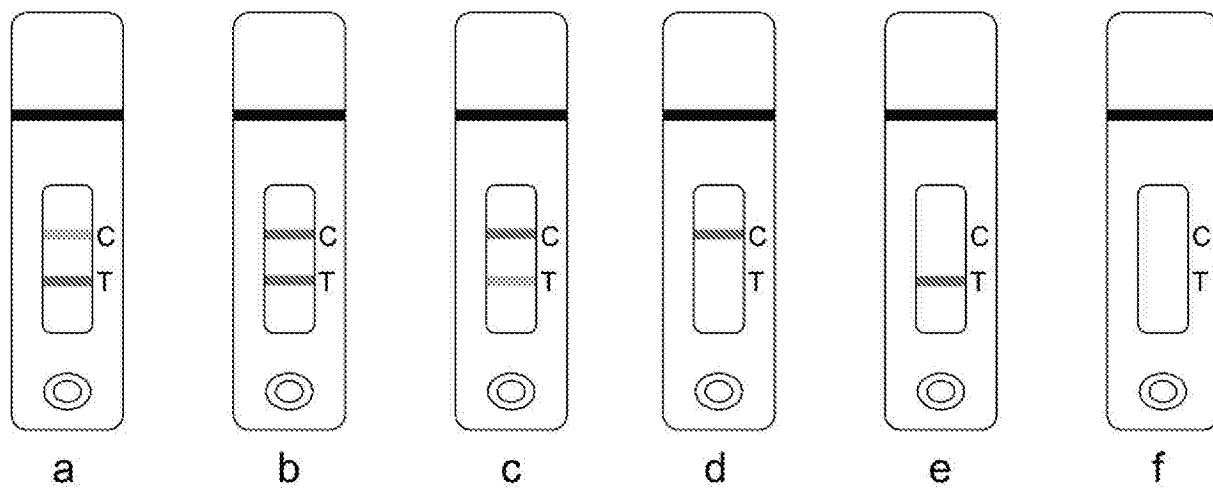


图2

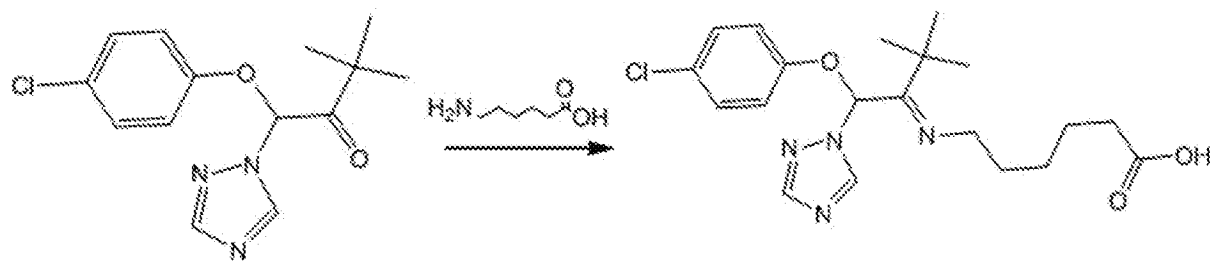


图3

专利名称(译)	一种检测三唑醇的试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105486872A	公开(公告)日	2016-04-13
申请号	CN201510973179.3	申请日	2015-12-23
[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 崔海峰 张瑜 潘立宁 胡斌 唐纲岭 刘惠民 罗晓琴		
发明人	陈黎 范子彦 崔海峰 张瑜 潘立宁 胡斌 唐纲岭 刘惠民 罗晓琴		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/577		
代理人(译)	姜振东		
其他公开文献	CN105486872B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测三唑醇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；其特征在于：所述反应膜上具有包被有三唑醇半抗原-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三唑醇单克隆抗体-胶体金标记物。本发明还提供一种应用上述试纸条检测样品中三唑醇的方法。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，能够实现对大批量的三唑醇样品进行快速检测和现场监控。

