



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105675874 B

(45)授权公告日 2017.08.25

(21)申请号 201610015347.2

G01N 21/78(2006.01)

(22)申请日 2016.01.11

审查员 段晓露

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105675874 A

(43)申请公布日 2016.06.15

(73)专利权人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信
息产业基地高新四街8号

(72)发明人 冯才伟 罗晓琴 冯静 万宇平

王兆芹 蒲小容 魏丽丽 王建霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

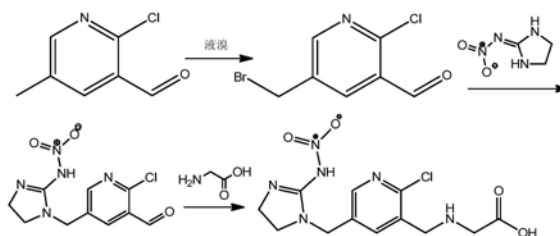
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

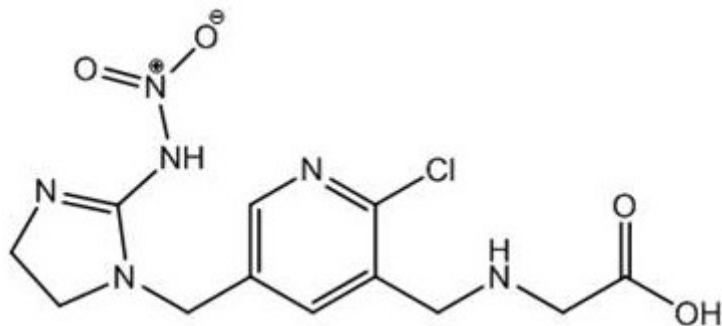
一种检测吡虫啉的胶体金试纸条及其应用

(57)摘要

本发明提供一种检测吡虫啉的胶体金试纸条及其应用。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,所述反应膜上具有包被有吡虫啉半抗原-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,所述吡虫啉半抗原是以2-氯-5-甲基吡啶-3-甲醛为起始原料,经过溴代反应,得到中间体产物,再与2-硝基亚氨基咪唑烷进行亲核取代反应,所得产物再与氨基乙酸缩合,获得带有四碳链长度间隔臂的羧基吡虫啉半抗原。本发明还提供一种应用上述试纸条检测样品中吡虫啉的方法。本发明提供的试纸条具有操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低、适于大批量样本筛查等优点,能够满足我国烟草监管部门开展现场监控和检测工作。



1. 一种检测吡虫啉的胶体金试纸条,包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板,所述反应膜上具有包被有吡虫啉半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗体的质控线,所述结合物释放垫喷涂有吡虫啉单克隆抗体-胶体金标记物,所述吡虫啉半抗原-载体蛋白偶联物由吡虫啉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、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白或人血清白蛋白,其特征在于所述吡虫啉半抗原是以2-氯-5-甲基吡啶-3-甲醛为起始原料,经过溴代反应,得到中间体2-氯-5-甲基溴代吡啶-3-甲醛产物,而后与2-硝基亚氨基咪唑烷进行亲核取代反应,得到醛基化的吡虫啉产物,再与氨基乙酸缩合,获得带有间隔臂的羧基吡虫啉半抗原,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。

3. 如权利要求1-2任一项所述的试纸条,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。

4. 如权利要求1所述的试纸条,其特征在于所述吡虫啉单克隆抗体是以吡虫啉半抗原-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将鼠源抗体免疫羊得到。

5. 一种制备权利要求1-4任一项所述试纸条的方法,其包括步骤:

1) 制备喷涂有吡虫啉单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

2) 制备具有包被有吡虫啉半抗原-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。

6. 一种检测烟草中吡虫啉残留的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

1) 样品前处理;

2) 用权利要求1-4任一项所述的试纸条进行检测;

3) 分析检测结果。

一种检测吡虫啉的胶体金试纸条及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测吡虫啉的胶体金试纸条及其应用,具体涉及一种用于检测吡虫啉的胶体金试纸条,其特别适用于烟草中吡虫啉残留的检测。

背景技术

[0002] 吡虫啉(IMI),1-(6-氯-3-吡啶甲基)-N-硝基-2-咪唑啉亚胺,属于新型烟碱类杀虫剂。IMI是昆虫烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)抑制剂,通过阻止IMI刺激AChR引起的昆虫神经信号传导而发挥杀虫作用,其兼具触杀、驱避、胃毒等多重杀虫活性和高效、低毒、广谱、内吸、残效期长等特点。近年来,吡虫啉已经广泛应用于水稻、棉花、茶树、大豆、烟草等作物来防治飞虱、介壳虫、白粉虱等农业害虫,而对烟草生产过程中的蚜虫、叶蝉等刺吸式口器害虫有特效。目前含IMI的农药产品已在120多个国家的140余种农作物上登记使用,在世界范围内吡虫啉的使用量已居所有杀虫剂的首位。该农药会对人类和哺乳动物产生慢性毒理效应,0.05mg/kg的吡虫啉就会损害人体淋巴细胞的遗传物质DNA。

[0003] 目前国内外已制订出多种农产品中IMI的最大残留限量标准(MRLs)。2008年欧盟重新审理和修正了IMI在近400中农产品中的MRLs,其中大部分谷物、水果、蔬菜中的MRL均在0.05mg/kg。而随着烟草和烟草制品的国际贸易日趋增加,一些发达国家已经制定了烟草及烟草制品中农药残留量的最大限量法规,如美国农业部1987年就制定了对进口烟草农药残留的限量指标,包括19种农药,世界上其它一些国家对多种农药在烟草(烟草制品)中的最大残留量制定了标准。综合德国、美国、西班牙和意大利制定的国家标准,对卷烟和烟叶中农药残留最高限量做出规定的就多达151种农药。为了提高烟草安全性,烟草科学研究合作中心制定了严格的农药最高残留限量标准,这是我国烟草贸易必须面对的技术壁垒。

[0004] 吡虫啉是极性化合物,具热不稳定性的特点,检测吡虫啉残留量常规方法有气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、气质联用法(GC-MS)、免疫分析法(ELISA)等方法。然而采用这些检测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,开发一种简单快速、适于烟草中吡虫啉残留的胶体金试纸条,可满足大量样品现场筛选和监控,能够更好地满足我国烟草公司、烟草监管部门等开展检测工作。

发明内容

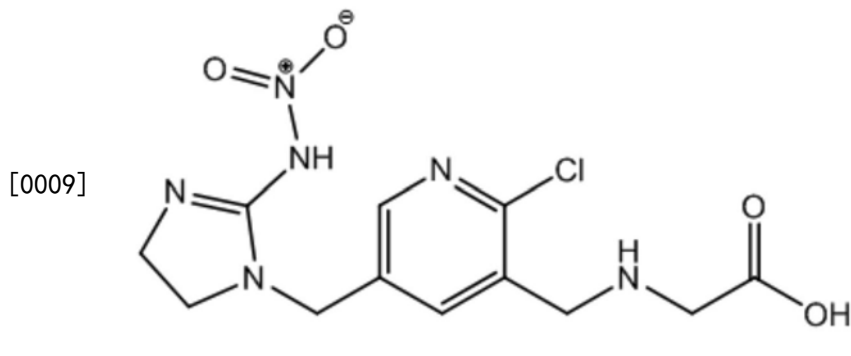
[0005] 本发明的目的在于提供一种能够检测烟草中吡虫啉残留量的胶体金试纸条,并且提供一种高效、准确、简便、适于现场监控和大量样本筛查的检测方法。

[0006] 本发明所提供的检测吡虫啉的胶体金试纸条,包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板;所述反应膜上具有包被有吡虫啉半抗原-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,所述结合物释放垫喷涂有吡虫啉单克隆抗体-胶体金标记物。

[0007] 所述吡虫啉半抗原-载体蛋白偶联物是由吡虫啉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、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白或人血清白蛋白。

[0008] 所述吡虫啉半抗原是以2-氯-5-甲基吡啶-3-甲醛为起始原料,经过溴代反应,得到中间体2-氯-5-甲基溴代吡啶-3-甲醛产物,而后与2-硝基亚氨基咪唑烷进行亲核取代反应,得到醛基化的吡虫啉产物,最后与氨基乙酸缩合,获得带有四碳链长度间隔臂的羧基吡虫啉半抗原产物,其分子结构式为:



[0010] 所述吡虫啉单克隆抗体是以吡虫啉半抗原-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将鼠源抗体免疫羊得到。

[0011] 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。

[0012] 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。

[0013] 本发明的另一个目的是提供一种制备上述试纸条的方法,其包括步骤:

[0014] 1) 制备喷涂有吡虫啉单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0015] 2) 制备具有包被有吡虫啉半抗原-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;

[0016] 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。

[0017] 具体地说,步骤包括:

[0018] 1) 半抗原制备:以2-氯-5-甲基吡啶-3-甲醛为起始原料,经过溴代反应,得到中间体2-氯-5-甲基溴代吡啶-3-甲醛产物,而后与2-硝基亚氨基咪唑烷进行亲核取代反应,得到醛基化的吡虫啉产物,最后与氨基乙酸缩合,获得带有四碳链长度间隔臂的羧基吡虫啉半抗原产物;

[0019] 2) 将吡虫啉半抗原与载体蛋白偶联,得到吡虫啉半抗原-载体蛋白偶联物;

[0020] 3) 用吡虫啉半抗原-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,得到吡虫啉单克隆杂交瘤细胞株;

[0021] 4) 提取小鼠IgG免疫健康山羊,得到羊抗鼠抗抗体;

[0022] 5) 分别将吡虫啉半抗原-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;

[0023] 6) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

[0024] 7) 将制备的吡虫啉单克隆抗体加入制备的胶体金中,得到吡虫啉单克隆抗体-胶

体金标记物；

[0025] 8) 将吡虫啉单克隆抗体-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；

[0026] 9) 将样品吸收垫用含0.5%牛血清白蛋白(体积分数)、pH为7.2、0.1mol/L磷酸盐缓冲液浸泡2h,37℃下烘干2h；

[0027] 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3mm宽的小条,加塑料盒,真空包装,4~30℃条件下可保存12个月。

[0028] 本发明的另一个目的是提供一种应用上述试纸条检测烟草中吡虫啉残留的方法,它包括如下步骤：

[0029] (1) 样品前处理；

[0030] (2) 用试纸条进行检测；

[0031] (3) 分析检测结果。

[0032] 本发明的吡虫啉快速检测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,将吡虫啉单克隆抗体-胶体金标记物固定于结合物释放垫上,样品中的吡虫啉在流动过程中,与结合物释放垫上的吡虫啉单克隆抗体-胶体金标记物结合,形成药物-抗体-胶体金标记物。样本中的药物与反应膜检测线上的吡虫啉半抗原-载体蛋白偶联物竞争结合吡虫啉单克隆抗体-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吡虫啉残留。

[0033] 检测时,样品经处理后滴入试纸条卡孔内,当吡虫啉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吡虫啉半抗原-载体蛋白偶联物结合,在检测线(T)和质控线(C)内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;如果吡虫啉在样品中的浓度等于或高于检测限,单克隆抗体-胶体金标记物会与吡虫啉全部结合,从而在T线处因为竞争反应不会与吡虫啉半抗原-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。

[0034] 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。

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 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、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吡虫啉残留的方法简便、快速、直观、准确、适用范围广、成本低、易推广使用。

附图说明

[0038] 图1为吡虫啉半抗原合成图。

[0039] 图2为试纸条剖面结构示意图。

[0040] 图3为试纸条检测结果判定图。

具体实施方式

[0041] 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。

[0042] 实施例1 吡虫啉检测试纸条的制备

[0043] 该试纸条的制备方法主要包括以下步骤:

[0044] 1) 制备喷涂有吡虫啉单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0045] 2) 制备具有包被有吡虫啉半抗原-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;

[0046] 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。

[0047] 下面分步详细叙述:

[0048] 1、吡虫啉半抗原的合成(合成路线见附图1)及鉴定

[0049] 1) 取2-氯-5-甲基吡啶-3-甲醛1.0g,加四氯化碳溶解,0℃滴加液溴0.6ml,搅拌,缓慢恢复至室温,在光照下,搅拌反应2h.停止反应,加水,萃取,有机相水洗,浓缩,上硅胶柱,石油醚/乙酸乙酯(v/v,5:1)洗脱分离,得到溴代2-氯-5-乙基吡啶醛1.3g,收率95%。

[0050] 核磁鉴定¹H NMR (CDCl₃,300MHZ) δ:4.473 (2,2H), 7.964 (4,1H,d,J=1.906), 8.061 (5,1H,d,J=1.906), 10.056 (9,1H)

[0051] 2) 取1.3g溴代2-氯-5-乙基吡啶醛加DMF溶解,加KOH0.43g,加碘化钠0.1g,搅拌,加2-硝基亚氨基咪唑烷0.81g,80℃搅拌4h.停止反应,TLC检测,原料基本反应完全,加水,乙酸乙酯萃取,分去水相,有机相浓缩,上硅胶柱,二氯甲烷/甲醇(v/v,10:1)洗脱,分离,得到醛基吡虫啉1.46g,收率92%。

[0052] 核磁鉴定¹H NMR (CDCl₃,300MHZ) δ:8.426 (5,1H,d,J=1.896), 7.869 (6,1H,d,J=1.896), 10.057 (7,1H), 4.407 (10,2H), 3.434 (13,1H,ddd,J=8.560,J=4.290,J=0.000), 3.434 (13,1H,ddd,J=8.060,J=4.290,J=0.000), 3.629 (16,1H,ddd,J=8.560,J=4.290,J=0.000), 3.629 (16,1H,ddd,J=8.060,J=4.290,J=0.000)

[0053] 3) 1.46g醛基吡虫啉加乙醇溶解,加碳酸氢钠0.58g,搅拌,加氨基乙酸0.47g,70℃水浴反应3h.TLC检测,原料反应完全,停止加热,冷却到室温,加硼氢化钠0.51g,室温搅拌2h,停止反应,旋蒸,除去有机溶剂,加水,调节PH值到4,氯仿萃取,分去水相,蒸干,得到黄色油状物,乙腈/正己烷(v/v,3:1)重结晶,得到氨基酸化吡虫啉产物1.68g,收率95%。

[0054] 核磁鉴定¹H NMR (CDCl₃,300MHZ) δ:7.905 (5,1H,d,J=1.624), 7.336 (6,1H,d,J=1.624), 3.876 (7,2H), 4.282 (10,2H), 3.524 (11,2H), 3.435 (15,1H,ddd,J=8.060,J=4.290,J=0.000), 3.435 (15,1H,ddd,J=8.060,J=4.290,J=0.000), 3.630 (20,1H,ddd,J=8.060,J=4.290,J=0.000), 3.630 (20,1H,ddd,J=8.060,J=4.290,J=0.000)

[0055] 2、免疫原的制备

[0056] 取5mg半抗原,溶解于1ml DMF中;取10mg EDC和NHS用0.2ml水充分溶解后于加入半抗原溶液中,室温下搅拌24h,即可得到反应液A;称取BSA 50mg,使之充分溶解在3.8mL PBS (PH 7.2)中,将反应液A逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌24h;用0.01mol/L PBS 4℃透析3d,每天换3次透析液,以除去未反应的小分子物质,得到免疫原;分装,于-20

℃保存备用。

[0057] 3、包被原的制备

[0058] 取6mg半抗原,溶解于1mL DMF中;取10mg EDC和NHS用0.2ml水充分溶解后,加入半抗原溶液中,室温下搅拌24h,即可得到反应液A;称取OVA 50mg,使之充分溶解在3.8mL PBS (PH 7.2) 中,将反应液A逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌24h;用0.01mol/L PBS 4℃透析3d,每天换3次透析液,以除去未反应的小分子物质,得到包被原;分装,于-20℃保存备用。

[0059] 4、吡虫啉单克隆抗体的制备

[0060] (1) 动物免疫

[0061] 将步骤2得到的免疫原注入Balb/c小鼠体内,免疫剂量为150μg/只,使其产生抗血清。

[0062] (2) 细胞融合和克隆化

[0063] 取免疫Balb/c小鼠脾细胞,按8:1 (数量配比) 比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合,筛选得到稳定分泌吡虫啉单克隆抗体的红霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0064] (3) 细胞冻存和复苏

[0065] 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。

[0066] (4) 单克隆抗体的制备与纯化

[0067] 增量培养法:将杂交瘤细胞置于细胞培养基中,在37℃条件下进行培养,用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体,-20℃保存。

[0068] 所述细胞培养基为向RPMI1640培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠,使小牛血清在细胞培养基中的终浓度为20% (质量分数),碳酸氢钠在细胞培养基中的终浓度为0.2% (质量分数);所述细胞培养基的pH为7.4。

[0069] 5、羊抗鼠抗抗体的制备

[0070] 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,得到羊抗鼠抗体。

[0071] 6、吡虫啉单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0072] (1) 胶体金的制备

[0073] 用双蒸去离子水将1%氯金酸稀释成0.01% (质量分数),取100ml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2.5ml 1%柠檬酸三钠,继续匀速搅拌加热至溶液呈透亮的红色时停止,冷却至室温后用去离子水恢复到原体积,4℃保存。制备好的胶体金外观纯净、透亮、无沉淀和漂浮物,液体表面无漂浮物,在日光下观察胶体金的颜色为酒红色。

[0074] (2) 吡虫啉单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0075] 在磁力搅拌下,用0.2mol/L碳酸钾溶液调胶体金的pH值至7.2,按每毫升胶体金溶液中加入20~50μg抗体的标准向胶体金溶液中加入吡虫啉单克隆抗体,继续搅拌混匀30min;静置10min后加入10%BSA,使其在胶体金溶液中的终浓度为1% (体积分数),静置10min。12000r/min、4℃离心40min,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。

[0076] 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0.02mol/L磷酸盐缓冲液。

[0077] 7、结合物释放垫的制备

[0078] 将结合物释放垫浸泡于含0.5%BSA(质量分数)、pH为7.2、0.5mol/L的磷酸盐缓冲液中，均匀浸湿1h，37℃烘3h备用。用Isoflow喷膜仪将制备好的吡虫啉单克隆抗体-胶体金标记物均匀喷涂在结合物释放垫上，每1cm结合物释放垫喷涂0.01ml吡虫啉单克隆抗体-胶体金标记物后，置于37℃环境中(湿度<20%)60min后取出，置于干燥环境(湿度<20%)中保存备用。

[0079] 8、反应膜的制备

[0080] 将吡虫啉半抗原-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。

[0081] 包被过程：用磷酸缓冲液将吡虫啉半抗原-卵清蛋白偶联物稀释到1mg/ml，用Isoflow点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测线(T线)，包被量为1.0μl/cm；用0.01mol/L、pH7.4的磷酸盐缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释到200μg/ml，用Isoflow点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的质控线(C线)，包被量为1.0μl/cm。将包被好的反应膜置于37℃条件下干燥2h，备用。

[0082] 9、样品吸收垫的制备

[0083] 将样品吸收垫置于含0.5%牛血清白蛋白(体积分数)、pH 7.2、0.1mol/L磷酸盐缓冲液中浸泡2h，37℃烘2h备用。

[0084] 10、试纸条的组装

[0085] 根据附图2所示试纸条剖面结构，将样品吸收垫(1)、结合物释放垫(2)、反应膜(3)、吸水垫(4)依次按顺序粘贴在PVC底板(7)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(5)和质控线(6)，检测线(T线)和质控线(C线)均为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3mm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。

[0086] 实施例2 样品中吡虫啉残留的检测

[0087] 1、样品的前处理

[0088] 称取1.0±0.05g粉碎的样本至10ml聚苯乙烯离心管中；加入6ml样本提取液(80%甲醇)，振荡5min；静置后移取0.1ml上清液和0.9ml样本稀释液(0.02mol/L PBS)混合得到待检样本液。

[0089] 2、用试纸条进行检测

[0090] 用移液器取待检样本溶液100ul垂直滴于加样孔中；液体流动时开始计时，反应5min后可判读结果，10min内判读结果有效。

[0091] 3、分析检测结果

[0092] 阴性(-)：T线显色比C线显色深或与C线显色一致，表示样品中吡虫啉浓度低于检测限，如图3a、3b。

[0093] 阳性(+) :T线显色比C线显色浅或T线不显色,表示样品中吡虫啉浓度等于或高于检测限,如图3c、3d。

[0094] 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3e、3f。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。

[0095] 实施例3 样品检测实例

[0096] 1、检测限试验

[0097] 取空白烟叶样本,在其中分别添加吡虫啉至终浓度为2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg,取试纸条进行检测,每个样本重复测定三次。

[0098] 用试纸条检测烟草样本时,当其中吡虫啉添加浓度为2.5mg/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;当其中吡虫啉添加浓度为5mg/kg、10mg/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,表明本试纸条对烟草中吡虫啉的检测限为5mg/kg。

[0099] 2、假阳性率、假阴性率试验

[0100] 取已知吡虫啉含量大于5mg/kg的烟草阳性样本和含量小于5mg/kg的烟草阴性样本各20份,用三批试纸条进行检测,计算其阴阳性率。结果见表1。

[0101] 表1 检测烟草样本结果

[0102]

浓度 批次	烟草样本 (20 份)	烟草样本 (20 份)
1	20 份阳性	20 份阴性
2	20 份阳性	20 份阴性
3	20 份阳性	20 份阴性

[0103] 结果表明:用3个批次生产的试纸条检测阳性烟草样本时,结果全为阳性,可知阳性样本符合率为100%,假阴性率为0;检测20份阴性烟草样本时,结果全为阴性,可知阴性符合率为100%,假阳性率为0。说明本发明的检测吡虫啉的试纸条可以对烟草中吡虫啉残留进行快速检测。

[0104] 3、特异性试验

[0105] 用吡虫啉试纸条检测100mg/kg啶虫脒、多菌灵、甲霜灵、异菌脲药物。结果显示,试纸条质控线和检测线均显色,呈阴性。说明本试纸条对100mg/kg啶虫脒、多菌灵、甲霜灵、异菌脲药物无交叉反应。

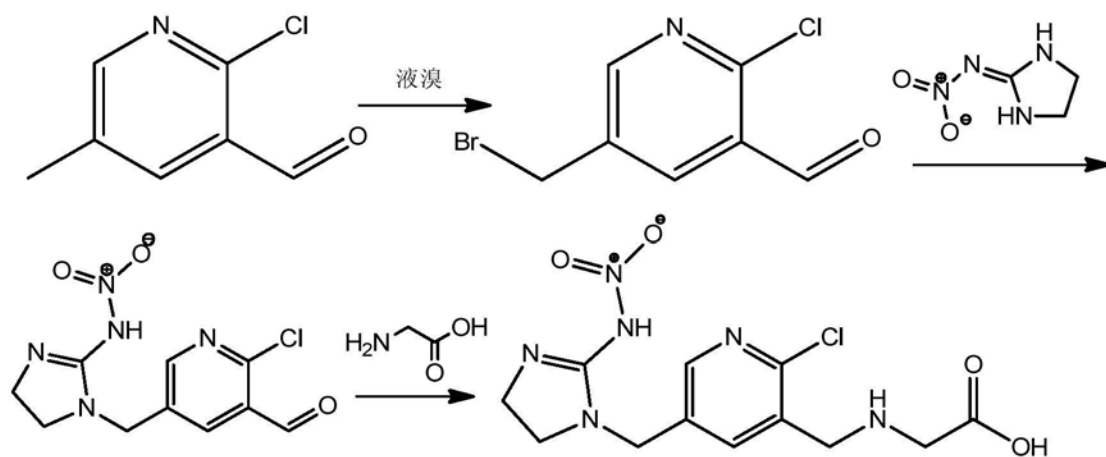


图1

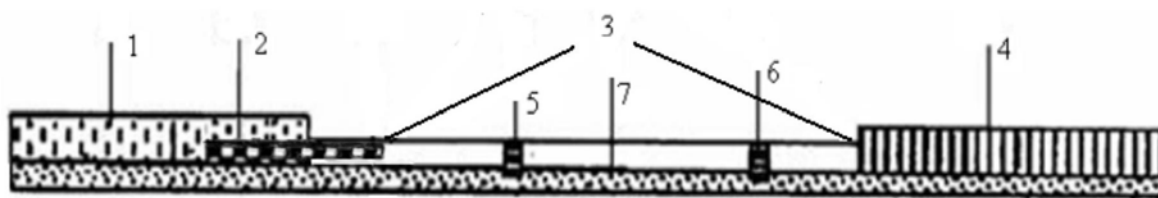


图2

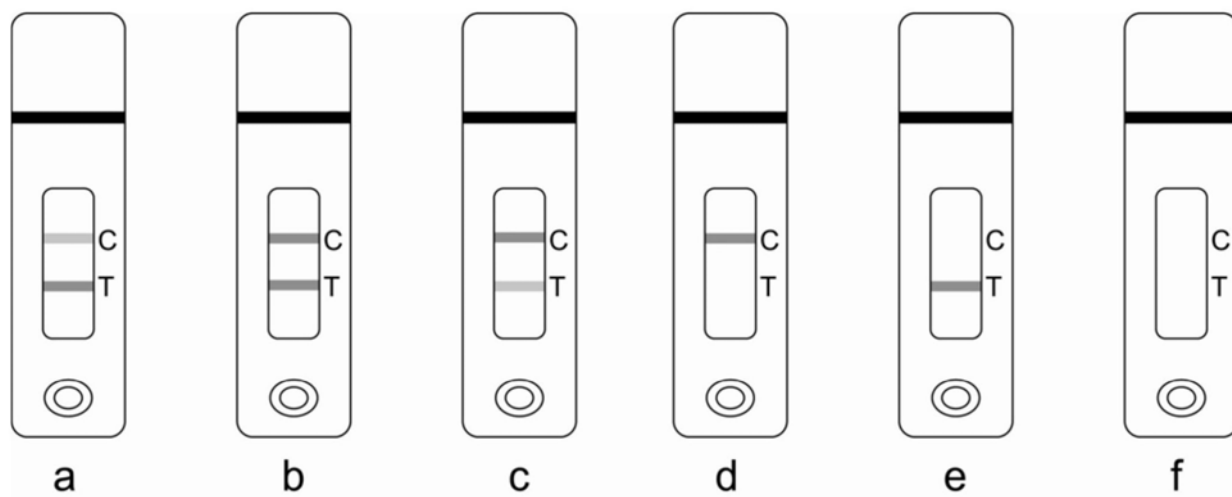


图3

专利名称(译)	一种检测吡虫啉的胶体金试纸条及其应用		
公开(公告)号	CN105675874B	公开(公告)日	2017-08-25
申请号	CN201610015347.2	申请日	2016-01-11
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	冯才伟 罗晓琴 冯静 万宇平 王兆芹 蒲小容 魏丽丽 王建霞		
发明人	冯才伟 罗晓琴 冯静 万宇平 王兆芹 蒲小容 魏丽丽 王建霞		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/531 G01N33/532 G01N21/78		
CPC分类号	G01N21/78 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/577		
审查员(译)	段晓露		
其他公开文献	CN105675874A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测吡虫啉的胶体金试纸条及其应用。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，所述反应膜上具有包被有吡虫啉半抗原-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，所述吡虫啉半抗原是以2-氯-5-甲基吡啶-3-甲醛为起始原料，经过溴代反应，得到中间体产物，再与2-硝基亚氨基咪唑烷进行亲核取代反应，所得产物再与氨基乙酸缩合，获得带有四碳链长度间隔臂的羧基吡虫啉半抗原。本发明还提供一种应用上述试纸条检测样品中吡虫啉的方法。本发明提供的试纸条具有操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低、适于大批量样本筛查等优点，能够满足我国烟草监管部门开展现场监控和检测工作。

