



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109298191 A

(43)申请公布日 2019.02.01

(21)申请号 201811155328.5

(22)申请日 2018.09.30

(71)申请人 云南省烟草农业科学研究院
地址 650021 云南省昆明市圆通街33号

(72)发明人 逢涛 李勇 师君丽 晋艳
卢秀萍 罗贵昆 孔光辉

(74)专利代理机构 昆明知道专利事务所(特殊
普通合伙企业) 53116
代理人 谢乔良 姜开远

(51)Int.Cl.

G01N 33/94(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书3页 说明书8页 附图1页

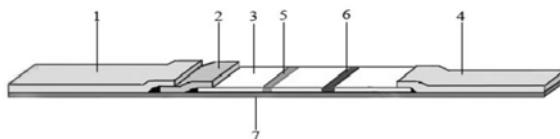
(54)发明名称

一种腈菌唑胶体金检测试纸条及其制备方
法与应用

(57)摘要

本发明公开一种腈菌唑胶体金检测试纸条及
其制备方法与应用。所述检测试纸条的样品吸
收垫、结合物释放垫和反应膜从左至右、从上至
下依次结合在PVC底板同一面，结合物释放垫与
反应膜的一端重叠，吸水垫结合在反应膜另一
端，反应膜包被腈菌唑抗原构成的检测线和包被
二抗构成的质控线，结合物释放垫包被腈菌唑抗
体-胶体金标记物。制备方法包括腈菌唑抗原制
备、腈菌唑多克隆抗体制备、胶体金制备、腈菌唑
多克隆抗体-胶体金标记物制备、羊抗兔抗抗体
制备、胶体金检测试纸条组装步骤。应用是腈菌
唑胶体金检测试纸条用于检测植物组织中腈菌
唑。本发明检测简单、快速、准确，能同时检测大
批量样本，满足烟草等植物组织中腈菌唑残留快
速检测的需求。

A
CN 109298191



CN

1. 一种腈菌唑胶体金检测试纸条，包括样品吸收垫(1)、结合物释放垫(2)、反应膜(3)、吸水垫(4)、PVC底板(7)，所述样品吸收垫(1)、结合物释放垫(2)和反应膜(3)按从左至右、从上至下的顺序依次结合在PVC底板(7)的同一面上，所述结合物释放垫(2)与反应膜(3)的一端重叠，所述吸水垫(4)结合在反应膜(3)的另一端，其特征在于所述反应膜(3)包被有腈菌唑抗原构成的检测线(5)和包被二抗构成的质控线(6)，所述结合物释放垫(2)上包被有腈菌唑抗体-胶体金标记物。

2. 根据权利要求1所述腈菌唑胶体金检测试纸条，其特征在于所述结合物释放垫(2)的一端伸入样品吸收垫(1)的下方至样品吸收垫(1)长度的1/2~1/3处。

3. 根据权利要求1所述腈菌唑胶体金检测试纸条，其特征在于所述质控线(6)包被的二抗为羊抗兔抗抗体，所述检测线(5)包被的腈菌唑抗原和/或质控线(6)包被的羊抗兔抗抗体的包被量为 $1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

4. 一种腈菌唑胶体金检测试纸条的制备方法，其特征在于包括腈菌唑抗原制备、腈菌唑多克隆抗体制备、胶体金制备、腈菌唑多克隆抗体-胶体金标记物制备、羊抗兔抗抗体制备、胶体金检测试纸条组装步骤，具体包括：

A、腈菌唑抗原制备：

A1、称取腈菌唑1.45 g溶解于2 mL二氯甲烷中，分别再加入2.5 mL的30wt%过氧化氢水溶液、四丁基硫酸氢铵0.34 g和20wt%氢氧化钠水溶液1.9 mL，反应混合物在室温下1000~2000 rpm搅拌24 h，然后用5 mL二氯甲烷稀释，TLC分离， $5 \times 2 \text{ mL}$ 盐水水洗，收集沉淀的白色固体I；

A2、取0.7 g白色固体I溶解于0.96 mL浓硫酸中，并加热至70℃，再加入0.7 g/mL的亚硝酸钠溶液0.3 mL，继续升温至105℃搅拌3 h，后冷却至室温，再加入0.01mol/L氢氧化钠溶液0.5mL，经二氯甲烷提取3次，加入浓硫酸沉淀，得白色固体II，即腈菌唑半抗原；

A3、取白色固体II与载体蛋白通过碳化二亚胺法偶联，制备得到腈菌唑抗原；

B、腈菌唑多克隆抗体制备：将腈菌唑抗原制备兔抗腈菌唑血清并纯化，制备得到腈菌唑多克隆抗体；

C、胶体金制备：用柠檬酸三钠还原氯金酸法制备胶体金颗粒；

D、腈菌唑多克隆抗体-胶体金标记物制备：在磁力搅拌下，用0.2 mol/L的磷酸盐溶液调胶体金的pH值至7.0，按每毫升胶体金溶液中加入80~100 μg 抗体的标准向胶体金溶液中加入腈菌唑多克隆抗体，继续搅拌混匀，静置30 min，加入10%牛血清白蛋白搅拌混匀，使其在胶体金溶液中的终浓度为1wt%，静置30 min，12000 rpm、4℃离心30 min，弃上清液，沉淀用含有0.5~1wt%牛血清白蛋白及0.05~0.1wt%吐温-20，pH 7.4的0.1 mol/L的磷酸盐溶液洗涤两次，用体积为初始胶体金体积1/10的磷酸盐溶液将沉淀重悬得到胶体金多克隆抗体-胶体金标记物；

E、羊抗兔抗抗体制备：由兔源腈菌唑抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫制备得到羊抗兔抗抗体；

F、胶体金检测试纸条组装：将反应膜贴于PVC底板上，将腈菌唑抗原、羊抗兔抗抗体分别喷涂于反应膜的检测线及质控线；将样品吸收垫、结合物释放垫金标垫、吸水垫依次贴于含有反应膜的PVC底板上，得到腈菌唑胶体金检测试纸条。

5. 根据权利要求4所述腈菌唑胶体金检测试纸条的制备方法，其特征在于所述B步骤包

括下述分步骤：

B1、选取2只6月龄以上,2~3 kg雌性新西兰大白兔,制备兔抗腈菌唑血清;

第一次免疫,采用弗氏完全佐剂100 μL 与等体积的无菌水混匀后,背部皮下进行多点预免疫,200 $\mu\text{L}/\text{只}$;初次免疫后第7天,将100 μL 弗氏不完全佐剂与5 mg/mL腈菌唑抗原100 μL 等量混合乳化,经兔背部皮下多点注射,200 $\mu\text{L}/\text{只}$;第14天,以100 μL 弗氏不完全佐剂与5 mg/mL腈菌唑抗原100 μL 混合乳化,经兔背部皮下多点注射,200 $\mu\text{L}/\text{只}$;第28天,以100 μL 弗氏不完全佐剂与5 mg/mL腈菌唑抗原100 μL 混合乳化,经兔背部皮下多点注射,200 $\mu\text{L}/\text{只}$;之后,每隔2周加免1次,不加佐剂,100 $\mu\text{L}/\text{只}$;免疫前一天采血,用间接ELISA法测定抗体效价,若效价到1:2000,则停止免疫,于颈动脉采血,收集血清,于-20℃保存备用;

B2、将B1得到的血清经10000 rpm离心10 min,再以0.22 μm 滤膜过滤,然后以4倍体积的0.05 mol/L、pH4.0乙酸溶液稀释处理,用10 mg/mL的NaOH调pH至4.5,加入80 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 辛酸,并于室温下搅拌1 h,后经10000 rpm离心15 min,弃沉淀,取上清再经0.22 μm 滤膜过滤,加入1/10体积的5 mmol/L、pH7.5磷酸盐溶液,用10 mg/mLNaOH调pH至7.4,得到混合液并置冰浴中;

B3、在冰浴中,向上述混合液中缓慢加入等体积的饱和硫酸锌,达到45%的饱和度,磁力搅拌30 min后,静置12 h,再于4 ℃下经10000 rpm离心15 min后,弃上清,加入5 mmol/L、pH7.5的磷酸盐溶液恢复至原体积,涡旋混匀,装入透析袋,以5 mmol/L、pH7.5 的磷酸盐溶液于4 ℃透析12 h,吸取透析后的腈菌唑多克隆抗体,使用截留分子量为30 KD的15 mL超滤管,10000 rpm离心15 min进行浓缩,浓缩腈菌唑多克隆抗体于-20 ℃保存。

6. 根据权利要求4所述的腈菌唑胶体金检测试纸条的制备方法,其特征在于所述C步骤中用双蒸去离子水将1wt%氯金酸稀释成0.02wt%,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2.5 mL 1wt%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,制备得到胶体金。

7. 根据权利要求4所述的腈菌唑胶体金检测试纸条的制备方法,其特征在于所述E步骤中的腈菌唑抗体可为腈菌唑单克隆抗体或腈菌唑多克隆抗体,由腈菌唑抗原与载体蛋白偶联物免疫动物制备得到;所述载体蛋白为牛血清白蛋白、血蓝蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白或甲状腺蛋白。

8. 如权利要求4所述的腈菌唑胶体金检测试纸条的制备方法,其特征在于所述F步骤中的样品吸收垫在组装之前置于含有1.0wt%牛血清白蛋白的pH7.2磷酸盐溶液中浸泡1 h后经37 ℃烘干2 h,所述反应膜的检测线及质控线分别包被腈菌唑抗原、羊抗兔抗抗体后经37 ℃烘干1.5 h。

9. 根据权利要求1至8任意一项所述腈菌唑胶体金检测试纸条在检测植物组织中腈菌唑的应用。

10. 根据权利要求9所述腈菌唑胶体金检测试纸条在检测植物组织中腈菌唑的应用,其特征在于用于烟草组织中腈菌唑的检测,检测具体步骤为:

A、烟草样品的前处理过程:称取新鲜烟叶样品1.0 g或烤后烟叶样品0.5 g置入50 mL离心管中,加入5 mL甲醇,振荡器中速或手摇提取5 min,吸取上清液100 μL 加入到900 μL 、0.1 mol/L 的PH7.2磷酸盐溶液中混匀,得到样本分析液;

B、用腈菌唑胶体金检测试纸条进行检测:用吸管吸取样本分析液2~3滴垂直滴加于腈

菌唑胶体金检测试纸条的加样孔,液体流动时开始计时,反应5~10 min,判定结果;

C、分析检测结果:

阴性:检测线和质控线都显红色,表示样品中腈菌唑药物浓度低于检测限;

阳性:检测线无显色或较质控线浅,质控线显色,表示样品中腈菌唑药物浓度等于或高于检测限;

无效:未出现质控线,表明不正确的操作过程或试纸条已变质失效,在此情况下,应用新的试纸条重新测试。

一种腈菌唑胶体金检测试纸条及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,具体涉及一种腈菌唑胶体金检测试纸条及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 腈菌唑,通用名称:Myclobutanil,是一类具保护和治疗活性的内吸性三唑类杀菌剂。罗门哈斯公司于1988年开发出腈菌唑产品,并用于一系列作物的杀菌防治。腈菌唑主要对病原菌的麦角甾醇的生物合成起抑制作用,对子囊菌、担子菌均具有较好的防治效果,具有强内吸,药效高,持效期长等特点,多用于防治白粉病、锈病、黑星病,灰斑病、褐斑病、黑穗病。我国是烟草大国,随着烟草品种和数量的不断增加,烟草病虫害的发生也日益加重,腈菌唑作为防治烟草病虫害的重要药剂,在我国被广泛使用。

[0003] 腈菌唑药物不合理使用会造成药物残留,人们如果长时间摄入食物中残留的腈菌唑药物,会对人体造成不良影响,主要表现在损害神经系统,降低生物体的免疫能力诱发肿瘤等,因此必须重视药草中腈菌唑药物的残留问题。

[0004] 目前,我国有报道采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)检测烟草中腈菌唑残留量;气相色谱串联质谱(GC-MS/MS)测定大葱、烟草、西红柿、化妆品上腈菌唑的残留。但超高效液相色谱串联质谱、气相色谱串联质谱检测均易受杂质干扰影响,需要复杂的样品前处理过程,检测过程中所用的大量溶剂易污染环境,且所需检测时间长,对检测人员的专业能力要求高。由于烟草成分复杂,诸如烟碱含量可达1~3%,而且烟叶中蛋白质含量也非常高,一般可达15%,最多可达到17%,造成干扰物质多,现有技术中的检测方法不能有效去除烟叶中的烟碱和蛋白质等杂质,而烟碱和蛋白质的存在容易形成干扰峰,影响对目标物的检测准确性,因此不能完全适用于烟草的测定。

发明内容

[0005] 本发明针对现有技术存在的问题及不足,提供了一种腈菌唑胶体金检测试纸条,还提供了一种腈菌唑胶体金检测试纸条的制备方法,进一步提供了一种腈菌唑胶体金检测试纸条的应用。

[0006] 本发明的腈菌唑胶体金检测试纸条是这样实现的:样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫、PVC底板,所述样品吸收垫、结合物释放垫和反应膜按从左至右、从上至下的顺序依次结合在PVC底板的同一面上,所述结合物释放垫与反应膜的一端重叠,所述吸水垫结合在反应膜的另一端,其特征在于所述反应膜包被有腈菌唑抗原构成的检测线和包被二抗构成的质控线,所述结合物释放垫上包被有腈菌唑抗体-胶体金标记物。

[0007] 本发明的腈菌唑胶体金检测试纸条的制备方法是这样实现的:包括腈菌唑抗原制备、腈菌唑多克隆抗体制备、胶体金制备、腈菌唑多克隆抗体-胶体金标记物制备、羊抗兔抗体制备、胶体金检测试纸条组装步骤,具体包括:

A、腈菌唑抗原制备:

A1、称取腈菌唑1.45 g溶解于2 mL二氯甲烷中,分别再加入2.5 mL的30wt%过氧化氢水溶液、四丁基硫酸氢铵0.34 g和20wt%氢氧化钠水溶液1.9 mL,反应混合物在室温下1000~2000 rpm搅拌24 h,然后用5 mL二氯甲烷稀释,TLC分离,5×2 mL盐水水洗,收集沉淀的白色固体I;

A2、取0.7 g白色固体I溶解于0.96 mL浓硫酸中,并加热至70℃,再加入0.7 g/mL的亚硝酸钠溶液0.3 mL,继续升温至105℃搅拌3 h,后冷却至室温,再加入0.01moL/L氢氧化钠溶液0.5mL,经二氯甲烷提取3次,加入浓硫酸沉淀,得白色固体II,即腈菌唑半抗原;

A3、取白色固体II与载体蛋白通过碳化二亚胺法偶联,制备得到腈菌唑抗原;

B、腈菌唑多克隆抗体制备:将腈菌唑抗原制备兔抗腈菌唑血清并纯化,制备得到腈菌唑多克隆抗体;

C、胶体金制备:用柠檬酸三钠还原氯金酸法制备胶体金颗粒;

D、腈菌唑多克隆抗体-胶体金标记物制备:在磁力搅拌下,用0.2 mol/L的磷酸盐溶液调胶体金的pH值至7.0,按每毫升胶体金溶液中加入80~100 μg抗体的标准向胶体金溶液中加入腈菌唑多克隆抗体,继续搅拌混匀,静置30 min,加入10%牛血清白蛋白搅拌混匀,使其在胶体金溶液中的终浓度为1wt%,静置30 min,12000 rpm、4℃离心30 min,弃上清液,沉淀用含有0.5~1wt%牛血清白蛋白及0.05~0.1wt%吐温-20,pH 7.4的0.1 mol/L的磷酸盐溶液洗涤两次,用体积为初始胶体金体积1/10的磷酸盐溶液将沉淀重悬得到胶体金多克隆抗体-胶体金标记物;

E、羊抗兔抗抗体制备:由兔源腈菌唑抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫制备得到羊抗兔抗抗体;

F、胶体金检测试纸条组装:将反应膜贴于PVC底板上,将腈菌唑抗原、羊抗兔抗抗体分别喷涂于反应膜的检测线及质控线;将样品吸收垫、结合物释放垫金标垫、吸水垫依次贴于含有反应膜的PVC底板上,得到腈菌唑胶体金检测试纸条。

[0008] 本发明的腈菌唑胶体金检测试纸条的应用是这样实现的:腈菌唑胶体金检测试纸条在检测植物组织中腈菌唑的应用。

[0009] 本发明的腈菌唑胶体金检测试纸条具有准确度和精密度高、特异性强、操作简单、成本低、检测时间短、能同时检测多个样本、易于推广使用等优点,满足烟草等植物组织中腈菌唑残留快速检测的需求;本发明的腈菌唑胶体金检测试纸条组装方法通过制备腈菌唑抗原,并由此抗原进一步合成腈菌唑抗体,使得腈菌唑胶体金检测试纸条对腈菌唑检测灵敏度高达0.05μg/g。

附图说明

[0010] 图1为腈菌唑胶体金检测试纸条结构示意图;

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-PVC底板。

具体实施方式

[0011] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步的说明,但不以任何方式对本发明加以限制,基于本发明教导所作的任何变更或改进,均属于本发明的保护范围。

[0012] 如图1所示,本发明的腈菌唑胶体金检测试纸条,样品吸收垫1、结合物释放垫2、反应膜3、吸水垫4、PVC底板7,所述样品吸收垫1、结合物释放垫2和反应膜3按从左至右、从上至下的顺序依次结合在PVC底板7的同一面上,所述结合物释放垫2与反应膜3的一端重叠,所述吸水垫4结合在反应膜3的另一端,其特征在于所述反应膜3包被有腈菌唑抗原构成的检测线5和包被二抗构成的质控线6,所述结合物释放垫2上包被有腈菌唑抗体-胶体金标记物。

[0013] 所述结合物释放垫2的一端伸入样品吸收垫1的下方至样品吸收垫1长度的1/2~1/3处。

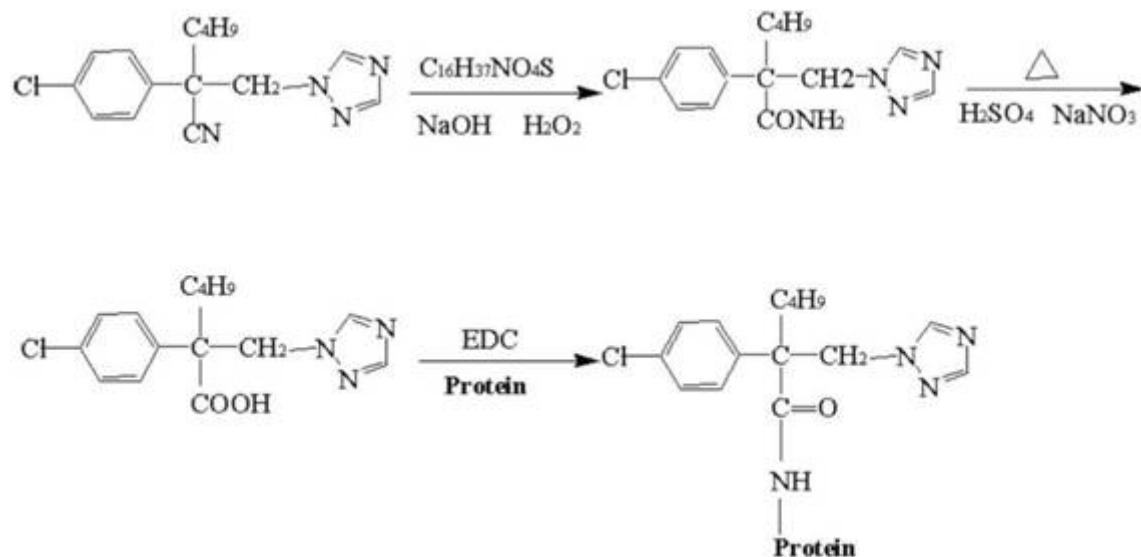
[0014] 所述质控线6包被的二抗为羊抗兔抗抗体,所述检测线5包被的腈菌唑抗原和/或质控线6包被的羊抗兔抗抗体的包被量为 $1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

[0015] 所述样品吸收垫1为无纺布或虑血膜,所述反应膜3为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜,所述结合物释放垫2为玻璃纤维,所述吸水垫4为吸水纸。

[0016] 本发明的腈菌唑胶体金检测试纸条的制备方法,包括腈菌唑抗原制备、腈菌唑多克隆抗体制备、胶体金制备、腈菌唑多克隆抗体-胶体金标记物制备、羊抗兔抗抗体制备、胶体金检测试纸条组装步骤,具体包括:

A、腈菌唑抗原制备:

腈菌唑抗原合成路线如下:



A、腈菌唑抗原制备:

A1、称取腈菌唑1.45 g溶解于2 mL二氯甲烷中,分别再加入2.5 mL的30wt%过氧化氢水溶液、四丁基硫酸氢铵0.34 g和20wt%氢氧化钠水溶液1.9 mL,反应混合物在室温下1000~2000 rpm搅拌24 h,然后用5 mL二氯甲烷稀释,TLC分离,5×2 mL盐水水洗,收集沉淀的白色固体I;

A2、取0.7 g白色固体I溶解于0.96 mL浓硫酸中,并加热至70°C,再加入0.7 g/mL的亚硝酸钠溶液0.3 mL,继续升温至105°C搅拌3 h,后冷却至室温,再加入0.01moL/L氢氧化钠溶液0.5mL,经二氯甲烷提取3次,加入浓硫酸沉淀,得白色固体II,即腈菌唑半抗原;

A3、取白色固体II与载体蛋白通过碳化二亚胺法偶联,制备得到腈菌唑抗原;

B、腈菌唑多克隆抗体制备:将腈菌唑抗原制备兔抗腈菌唑血清并纯化,制备得到腈菌

唑多克隆抗体；

C、胶体金制备：用柠檬酸三钠还原氯金酸法制备胶体金颗粒；

D、腈菌唑多克隆抗体-胶体金标记物制备：在磁力搅拌下，用0.2 mol/L的磷酸盐溶液调胶体金的pH值至7.0，按每毫升胶体金溶液中加入80~100 μg抗体的标准向胶体金溶液中加入腈菌唑多克隆抗体，继续搅拌混匀，静置30 min，加入10%牛血清白蛋白搅拌混匀，使其在胶体金溶液中的终浓度为1wt%，静置30 min，12000 rpm、4℃离心30 min，弃上清液，沉淀用含有0.5~1wt%牛血清白蛋白及0.05~0.1wt%吐温-20，pH 7.4的0.1 mol/L的磷酸盐溶液洗涤两次，用体积为初始胶体金体积1/10的磷酸盐溶液将沉淀重悬得到胶体金多克隆抗体-胶体金标记物；

E、羊抗兔抗体制备：由兔源腈菌唑抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫制备得到羊抗兔抗抗体；

F、胶体金检测试纸条组装：将反应膜贴于PVC底板上，将腈菌唑抗原、羊抗兔抗抗体分别喷涂于反应膜的检测线及质控线；将样品吸收垫、结合物释放垫金标垫、吸水垫依次贴于含有反应膜的PVC底板上，得到腈菌唑胶体金检测试纸条。

[0017] 所述B步骤包括下述分步骤：

B1、选取2只6月龄以上，2~3 kg雌性新西兰大白兔，制备兔抗腈菌唑血清；

第一次免疫，采用弗氏完全佐剂100 μL与等体积的无菌水混匀后，背部皮下进行多点预免疫，200 μL/只；初次免疫后第7天，将100 μL弗氏不完全佐剂与5 mg/mL腈菌唑抗原100 μL等量混合乳化，经兔背部皮下多点注射，200 μL/只；第14天，以100 μL弗氏不完全佐剂与5 mg/mL腈菌唑抗原100 μL混合乳化，经兔背部皮下多点注射，200 μL/只；第28天，以100 μL弗氏不完全佐剂与5 mg/mL腈菌唑抗原100 μL混合乳化，经兔背部皮下多点注射，200 μL/只；之后，每隔2周加免1次，不加佐剂，100 μL/只；免疫前一天采血，用间接ELISA法测定抗体效价，若效价到1:2000，则停止免疫，于颈动脉采血，收集血清，于-20℃保存备用；

B2、将B1得到的血清经10000 rpm离心10 min，再以0.22 μm滤膜过滤，然后以4倍体积的0.05 mol/L、pH4.0乙酸溶液稀释处理，用10 mg/mL的NaOH调pH至4.5，加入80 μL/mL辛酸，并于室温下搅拌1 h，后经10000 rpm离心15 min，弃沉淀，取上清再经0.22 μm滤膜过滤，加入1/10体积的5 mmol/L、pH7.5磷酸盐溶液，用10 mg/mLNaOH调pH至7.4，得到混合液并置冰浴中；

B3、在冰浴中，向上述混合液中缓慢加入等体积的饱和硫酸锌，达到45%的饱和度，磁力搅拌30 min后，静置12 h，再于4 ℃下经10000 rpm离心15 min后，弃上清，加入5 mmol/L、pH7.5的磷酸盐溶液恢复至原体积，涡旋混匀，装入透析袋，以5 mmol/L、pH7.5 的磷酸盐溶液于4 ℃透析12 h，吸取透析后的腈菌唑多克隆抗体，使用截留分子量为30 KD的15 mL超滤管，10000 rpm离心15 min进行浓缩，浓缩腈菌唑多克隆抗体于-20 ℃保存。

[0018] 所述C步骤中用双蒸去离子水将1wt%氯金酸稀释成0.02wt%，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2.5 mL 1wt%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，制备得到胶体金。

[0019] 所述E步骤中的腈菌唑抗体可为腈菌唑单克隆抗体或腈菌唑多克隆抗体，由腈菌唑抗原与载体蛋白偶联物免疫动物制备得到；所述载体蛋白为牛血清白蛋白、血蓝蛋白、卵

清蛋白、人血清白蛋白或甲状腺蛋白。

[0020] 所述F步骤中的样品吸收垫在组装之前置于含有1.0wt%牛血清白蛋白的pH7.2磷酸盐溶液中浸泡1 h后经37 °C烘干2 h,所述反应膜的检测线及质控线分别包被腈菌唑抗原、羊抗兔抗体后经37 °C烘干1.5 h。

[0021] 本发明的腈菌唑胶体金检测试纸条在检测植物组织中腈菌唑的应用。

[0022] 本发明的腈菌唑胶体金检测试纸条在检测植物组织中腈菌唑的应用,用于烟草组织中腈菌唑的检测,检测具体步骤为:

A、烟草样品的前处理过程:称取新鲜烟叶样品1.0 g或烤后烟叶样品0.5 g置入50 mL离心管中,加入5 mL甲醇,振荡器中速或手摇提取5 min,吸取上清液100 μL加入到900 μL、0.1 mol/L 的PH7.2磷酸盐溶液中混匀,得到样本分析液;

B、用腈菌唑胶体金检测试纸条进行检测:用吸管吸取样本分析液2~3滴垂直滴加于腈菌唑胶体金检测试纸条的加样孔,液体流动时开始计时,反应5~10 min,判定结果;

C、分析检测结果:

阴性:检测线和质控线都显红色,表示样品中腈菌唑药物浓度低于检测限;

阳性:检测线无显色或较质控线浅,质控线显色,表示样品中腈菌唑药物浓度等于或高于检测限;

无效:未出现质控线,表明不正确的操作过程或试纸条已变质失效;在此情况下,应用新的试纸条重新测试。

[0023] 实施例:腈菌唑胶体金检测试纸条的制备

1、腈菌唑抗原制备,即腈菌唑免疫抗原和腈菌唑包被抗原的制备:

1.1. 称取腈菌唑1.45 g溶解于2 mL二氯甲烷中,再加入2.5 mL的30wt%过氧化氢水溶液、四丁基硫酸氢铵0.34 g和1.9 mL的20wt%氢氧化钠水溶液,反应混合物在室温下1000~2000 rpm搅拌24 h,然后用5 mL二氯甲烷稀释,TLC分离,5×2 mL盐水水洗,收集沉淀的白色固体I。

[0024] 1.2、取白色固体I0.7 g 溶解于0.96 mL浓硫酸中,并加热至70 °C,后再加入0.7 g/mL的亚硝酸钠溶液0.3 mL,继续升温至105 °C搅拌3 h,后冷却至室温,再加入0.01mol/L 氢氧化钠溶液0.5mL,二氯甲烷提取3次,加入浓硫酸沉淀,得白色固体II,即为腈菌唑半抗原。

[0025] 1.3、取白色固体II 5 mg溶解于2.5 mL,0.1 mol/L 、pH 4.7 2-吗啉乙磺酸溶液中,再将25 mg 牛血清白蛋白,5 mg 碳化二亚胺溶解在200 μL蒸馏水中,将两种溶液混合,室温反应2 h,后用0.01 mol/L 磷酸盐溶液透析,得到腈菌唑抗原,作为免疫抗原。

[0026] 1.4、腈菌唑免疫抗原鉴定:将牛血清白蛋白、腈菌唑半抗原、腈菌唑免疫抗原用pH 7.4的磷酸盐溶液配成0.5 mg/mL的溶液,以0.01 mol/L pH 7.4 磷酸盐溶液调零,用紫外分光光度计在波长260~750 nm范围内进行扫描,绘制牛血清白蛋白、腈菌唑半抗原、腈菌唑免疫抗原的吸收曲线,并计算其结合比;结果显示:三者出现不同的吸收曲线,证明腈菌唑半抗原与牛血清白蛋白偶联成功,腈菌唑半抗原与牛血清白蛋白的结合比为15~18:1。

[0027] 1.5、腈菌唑包被抗原制备及鉴定:

腈菌唑包被抗原制备:腈菌唑包被抗原的制备按1.2至1.3的腈菌唑免疫抗原制备步骤制得,不同之处在于载体蛋白为血蓝蛋白;

腈菌唑包被抗原鉴定：同1.4的腈菌唑免疫抗原鉴定过程，三者出现不同的吸收曲线，证明腈菌唑半抗原与血蓝蛋白偶联成功，腈菌唑半抗原与血蓝蛋白的结合比为16~20:1。

[0028] 2、腈菌唑多克隆抗体制备：

2.1、兔抗腈菌唑血清制备：

选取2只6月龄以上，2~3 kg雌性新西兰大白兔，制备兔抗腈菌唑血清；

第一次免疫，采用弗氏完全佐剂100 μL 与等体积的无菌水混匀后，背部皮下进行多点预免疫，200 μL /只；初次免疫后第7天，将100 μL 弗氏不完全佐剂与5 mg/mL腈菌唑抗原100 μL 等量混合乳化，经兔背部皮下多点注射，200 μL /只；第14天，以100 μL 弗氏不完全佐剂与5 mg/mL腈菌唑抗原100 μL 混合乳化，经兔背部皮下多点注射，200 μL /只。第28天，以100 μL 弗氏不完全佐剂与5 mg/mL腈菌唑抗原100 μL 混合乳化，经兔背部皮下多点注射，200 μL /只。之后，每隔2周加免1次，不加佐剂，100 μL /只；免疫前一天采血，用间接ELISA法测定抗体效价，若效价到1:2000，则停止免疫，于颈动脉采血，收集血清，于-20℃保存备用。

[0029] 2.2、兔抗腈菌唑血清预处理：

将血清10000 rpm离心10 min，再以0.22 μm 滤膜过滤，然后以4倍体积的0.05 mol/L，pH4.0乙酸溶液稀释处理，用10 mg/mL NaOH调pH至4.5，加入80 μL /mL辛酸，并于室温下搅拌1 h，后10000 rpm离心15 min，弃沉淀。上清再经0.22 μm 滤膜过滤，加入1/10体积的5 mmol/L、pH7.5 磷酸盐溶液，用10 mg/mLNaOH调pH至7.4，置冰浴中。

[0030] 2.3、腈菌唑多克隆抗体纯化：

在冰浴中，向上述混合液中缓慢加入等体积的饱和硫酸锌，达到45%的饱和度，磁力搅拌30 min后，静置12 h，再于4 °C下10000 rpm离心15 min后，弃上清。加入5 mmol/L、pH7.5 磷酸盐溶液恢复至原体积，涡旋混匀，装入透析袋，以5 mmol/L、pH7.5 磷酸盐溶液于4 °C透析12 h，吸取透析后的腈菌唑多克隆抗体，使用截留分子量为30 KD的15 mL超滤管，10000 rpm离心15 min进行浓缩，浓缩腈菌唑多克隆抗体于-20℃保存。

[0031] 3、胶体金制备：

用双蒸去离子水将1wt%氯金酸稀释成0.02wt%，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2.5 mL 1wt%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。

[0032] 4、腈菌唑多克隆抗体-胶体金标记物制备：

在磁力搅拌下，用0.2 mol/L磷酸盐溶液调胶体金的pH值至7.0，按每毫升胶体金溶液中加入80~100 μg 抗体的标准向胶体金溶液中加入腈菌唑多克隆抗体，继续搅拌混匀，静置30 min，加入10wt%牛血清白蛋白搅拌混匀，使其在胶体金溶液中的终浓度为1wt%，静置30 min，12000 rpm、4°C离心30 min，弃上清液，沉淀用含有0.5~1wt% 牛血清白蛋白，0.05 ~0.1wt%吐温-20，pH 7.4的0.1 mol/L的磷酸盐溶液洗涤两次，用体积为初始胶体金体积1/10的磷酸盐溶液将沉淀重悬得到胶体金多克隆抗体-胶体金标记物。

[0033] 5、羊抗兔抗抗体由兔源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫制备得到。

[0034] 6、腈菌唑胶体金检测试纸条组装：

腈菌唑包被抗原用0.2 mol/L 磷酸盐溶液稀释至0.5 mg/mL，羊抗兔抗抗体用0.2 mol/L 磷酸盐溶液稀释至500 μg /mL；

样品吸收垫在组装之前置于含有1.0wt%牛血清白蛋白的pH7.2的磷酸盐溶液中浸泡1

h,然后置于37 °C烘干2 h;

将反应膜贴于PVC底板上,将上述腈菌唑抗原、羊抗兔抗抗体稀释液按1.0 μg/cm²的包被量分别喷涂于反应膜的检测线及质控线,包被后置于37 °C烘干1.5 h;将样品吸收垫、结合物释放垫金标垫、吸水垫依次贴于含有反应膜的PVC底板上,得到腈菌唑胶体金检测试纸条。

[0035] 将实施例制备得到的腈菌唑胶体金检测试纸条在37 °C老化试验条件下,保存一个月,各项指标仍然符合检测要求。

[0036] 应用例:烟草样品中腈菌唑残留的检测

1、烟草样品的前处理过程

称取新鲜烟叶样品1.0 g(用剪刀剪碎,约1 cm大小)或烤后烟叶样品0.5 g(粉末或烟丝),置入50 mL离心管中,加入5 mL甲醇中,振荡器中速或手摇提取5 min,吸取上清液100 μL加入到900 μL,0.1 mol/L PH7.2 的磷酸盐溶液中混匀,既得样本分析液。

[0037] 2、用腈菌唑胶体金检测试纸条进行检测

用吸管吸取样本分析液2~3滴(约70 μL)垂直滴加于实施例制备得到的腈菌唑胶体金检测试纸条的加样孔,液体流动时开始计时,反应5~10 min,判定结果,其他时间判定无效。

[0038] 3、分析检测结果

阴性:检测线和质控线都显红色,表示样品中腈菌唑药物浓度低于检测限;

阳性:检测线无显色或较质控线浅,质控线显色,表示样品中腈菌唑药物浓度等于或高于检测限;

无效:未出现质控线,表明不正确的操作过程或试纸条已变质失效;在此情况下,应用新的试纸条重新测试。

[0039] 4、检测限试验

取空白烟草样品,在其中分别添加腈菌唑至终浓度为0、2.5、5、10 μg/g,取实施例制备的腈菌唑胶体金检测试纸条进行检测,每个样品重复测定五次。

[0040] 用试纸条检测烟草样品时,当其中腈菌唑添加浓度为0、2.5 μg/g时,试纸条上显示出肉眼可见的两条红色线,呈阴性;当其中腈菌唑添加浓度为5 μg/g时,试纸条质控线显示红色,但检测线不显色,呈阳性;表明本试纸条对烟草中腈菌唑的检测限为5 μg/g。

[0041] 5、假阳性率、假阴性率试验

取已知腈菌唑含量10 μg/g的烟草阳性样品50份和含量0 μg/g的烟草阴性样品50份,用实施例制备的腈菌唑胶体金检测试纸条进行检测。检测50份阴性样品时,试纸条检出1份阳性,假阳性率为2 %;检测50份阳性样品时,结果全部为阳性,假阴性率为0。本发明试纸条检测假阳性率、假阴性率均符合试纸条检测标准要求,可以对烟草样品中腈菌唑进行检测。

[0042] 6、特异性试验

用实施例制备的腈菌唑胶体金检测试纸条对50 μg/g百菌清、吡虫啉、氯丁唑,三唑醇、三唑酮类似药物进行检测。结果显示,用试纸条检测50 μg/g百菌清、吡虫啉、氯丁唑,三唑醇、三唑酮时,试纸条质控线和检测线均显色,均呈现阴性,见表1,结果表明,本试纸条可特异性检测腈菌唑药物。

表 1 药物交叉反应试验

[0043]

药物	浓度 (μg/g)	检测结果
百菌清	50	呈阴性
吡虫啉	50	呈阴性
三唑醇	50	呈阴性
氯丁唑	50	呈阴性
三唑酮	50	呈阴性

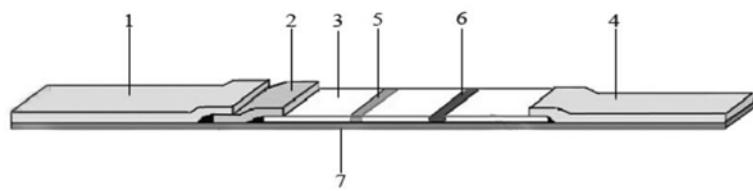


图1

专利名称(译)	一种腈菌唑胶体金检测试纸条及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN109298191A	公开(公告)日	2019-02-01
申请号	CN201811155328.5	申请日	2018-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	云南省烟草农业科学研究院		
申请(专利权)人(译)	云南省烟草农业科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	云南省烟草农业科学研究院		
[标]发明人	逢涛 李勇 师君丽 晋艳 卢秀萍 罗贵昆 孔光辉		
发明人	逢涛 李勇 师君丽 晋艳 卢秀萍 罗贵昆 孔光辉		
IPC分类号	G01N33/94 G01N33/558 G01N33/531 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/9446 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/558		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开一种腈菌唑胶体金检测试纸条及其制备方法与应用。所述检测试纸条的样品吸收垫、结合物释放垫和反应膜从左至右、从上至下依次结合在PVC底板同一面，结合物释放垫与反应膜的一端重叠，吸水垫结合在反应膜另一端，反应膜包被腈菌唑抗原构成的检测线和包被二抗构成的质控线，结合物释放垫包被腈菌唑抗体-胶体金标记物。制备方法包括腈菌唑抗原制备、腈菌唑多克隆抗体制备、胶体金制备、腈菌唑多克隆抗体-胶体金标记物制备、羊抗兔抗体制备、胶体金检测试纸条组装步骤。应用是腈菌唑胶体金检测试纸条用于检测植物组织中腈菌唑。本发明检测简单、快速、准确，能同时检测大批量样本，满足烟草等植物组织中腈菌唑残留快速检测的需求。

