



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107505467 A

(43)申请公布日 2017.12.22

(21)申请号 201710587465.5

(22)申请日 2017.07.18

(71)申请人 宁夏医科大学

地址 750004 宁夏回族自治区银川市兴庆区胜利南街1160号

(72)发明人 赵云生 殷玉洁 董美娟 毛福英
高晓娟 张新慧 付雪艳 王建寰
赵建军

(74)专利代理机构 北京方圆嘉禾知识产权代理有限公司 11385

代理人 董芙蓉

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

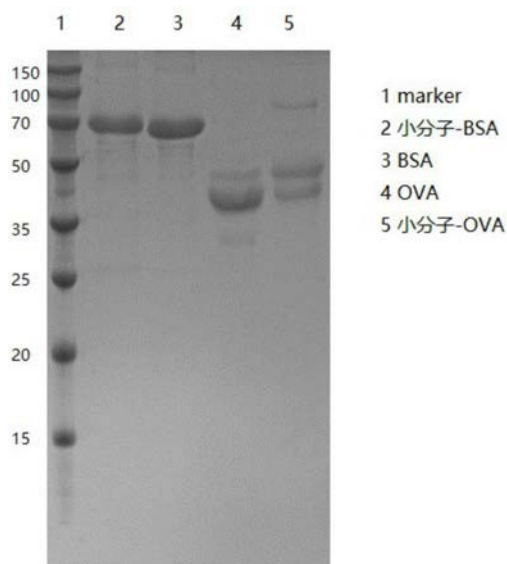
权利要求书2页 说明书16页 附图1页

(54)发明名称

拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂、试剂盒、应用及检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂、试剂盒、应用及检测方法,涉及化学检测技术领域。本发明的拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂包括拟除虫菊酯的单克隆抗体。本发明的拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂盒的检测试剂为所述拟除虫菊酯的单克隆抗体。本发明的检测试剂在制备拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂盒中的应用。利用本发明的ELISA检测试剂具有较好的特异性,灵敏度高,可检测出枸杞中含有间苯氧基苯甲酸(PBA)结构的所有菊酯类农药残留;本发明的ELISA检测方法操作方便,可快速检测出枸杞中菊酯类农药残留。



1. 一种拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂,其特征在于,所述检测试剂包括拟除虫菊酯的单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂,其特征在于,所述拟除虫菊酯残留为枸杞中拟除虫菊酯类农药残留。

3. 根据权利要求1所述的一种拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂,其特征在于,所述单克隆抗体的制备方法包括以下步骤:

用碳二亚胺法将间苯氧基苯甲酸和牛血清蛋白偶联合成免疫抗原;

用羰基二咪唑法将间苯氧基苯甲酸和鸡卵清蛋白偶联合成检测抗原;

用所述免疫抗原免疫小鼠,将其脾细胞与骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞;

用ELISA法筛选出阳性杂交瘤细胞;

用有限稀释法对所述杂交瘤细胞进行克隆并分离阳性杂交瘤细胞株,获得稳定分泌抗拟除虫菊酯的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

采用腹水诱导法,将含有所述杂交瘤细胞株的培养液注入小鼠腹腔产生腹水,所述腹水含有所述拟除虫菊酯的单克隆抗体。

4. 一种拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂盒,其特征在于,包括:

96孔酶标板;

检测抗原PBA-OVA;

拟除虫菊酯单克隆抗体;

HRP标记的羊抗鼠酶标二抗;

间苯氧基苯甲酸标准品溶液;

碳酸盐缓冲液,0.1M,pH=9.6;

洗涤液PBST,0.01M,pH=7.4

底物TMB显色液,0.15mg/ml,3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液;

反应终止液,2mol/L H₂SO₄。

5. 权利要求1所述的检测试剂在制备拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂盒中的应用。

6. 一种拟除虫菊酯残留的ELISA检测方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

用碳酸盐缓冲液将检测抗原稀释至1μg/ml,加入96孔酶标板,每孔加入100μL,4℃包被过夜;

向每孔中加入250μL洗涤液洗涤3-5次,弃洗涤液,拍干;

向96孔酶标板中加入枸杞样本50μl,拟除虫菊酯单克隆抗体50μl,加入空白对照,25℃反应30min;

向每孔中加入洗涤液洗涤3-5次,弃洗涤液,拍干;

向96孔酶标板每孔中加入用封闭液稀释1000倍的,HRP标记的羊抗鼠酶标二抗,每孔100μL,25℃避光反应30min;

向每孔中加入洗涤液并洗涤3-5次,弃洗涤液,拍干;

向96孔酶标板中加入酶底物TMB显色剂,每孔加入100μL,室温避光反应15min;

向96孔酶标板中加入终止液,每孔100μL,终止反应,用酶标仪在450nm波长下测定各孔吸光光度OD值;

结果判断:用磷酸盐缓冲液将间苯氧基苯甲酸标准品分别稀释成浓度为0,125,250,

500,1000及2000ppb的五个不同浓度后检测OD值;

以间苯氧基苯甲酸标准品质量浓度以10为底的对数为横坐标,以质量浓度分别为125、250、500、1000、2000ppb的间苯氧基苯甲酸标准品溶液的吸光度与质量浓度为0ppb的标准品溶液的吸光度比值为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,将枸杞样品中测得的吸光度值代入标准曲线,计算得枸杞中间苯氧基苯甲酸残留量。

拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂、试剂盒、应用及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及化学检测领域,尤其涉及一种拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂、试剂盒、应用及检测方法。

背景技术

[0002] 我国宁夏枸杞已大量生产并进行出口贸易,但枸杞病虫害发生严重,主要病虫害一年发生多代,虫类同期、虫态生活史重叠现象极为普遍,防治难度大,其中虫害有38种,病害有5种,早在2002年宁夏就已在全国率先开展“无公害枸杞行动计划”,选用高效低毒低残留农药,如拟除虫菊酯类农药、新开发的杂环类农药(吡虫啉)、生物源农药(苦参碱)等用于枸杞虫害防治。并对氰戊菊酯、氯氰菊酯及溴氰菊酯等具有间苯氧基苯甲酸(PBA)结构的菊酯类农药进行研究。

[0003] 目前国内外采用的农药残留检测方法主要有色谱法、波谱法和仪器分析法(如GC、HPLC、GC/MS、LC/MS、GC/MS+MS、LC/MS+MS)。以上方法虽检测准确,但成本高,耗时长,需要具备一定技术水平的专业人员才能进行操作,只适合在实验室进行,限制了该方法在大规模的农药残留监测和现场实时检测中的应用。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明实施例提供了一种拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂、试剂盒、应用及检测方法,主要目的是解决使用不方便、成本高及检测慢的问题。

[0005] 为达到上述目的,本发明主要提供了如下技术方案:

[0006] 一方面,本发明实施例提供了一种拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂,所述检测试剂包括拟除虫菊酯的单克隆抗体。

[0007] 作为优选,所述拟除虫菊酯残留为枸杞中拟除虫菊酯类农药残留。

[0008] 作为优选,所述单克隆抗体的制备方法包括以下步骤:

[0009] 用碳二亚胺法将间苯氧基苯甲酸和牛血清蛋白偶联合成免疫抗原;

[0010] 用羰基二咪唑法将间苯氧基苯甲酸和鸡卵清蛋白偶联合成检测抗原;

[0011] 用所述免疫抗原免疫小鼠,将其脾细胞与骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞;

[0012] 用ELISA法筛选出阳性杂交瘤细胞;

[0013] 用有限稀释法对所述杂交瘤细胞进行克隆并分离阳性杂交瘤细胞株,获得稳定分泌抗拟除虫菊酯的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0014] 采用腹水诱导法,将含有所述杂交瘤细胞株的培养液注入小鼠腹腔产生腹水,所述腹水含有所述拟除虫菊酯的单克隆抗体。

[0015] 另一方面,本发明实施例提供了一种拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂盒,包括:

[0016] 96孔酶标板;

[0017] 检测抗原PBA-OVA;

[0018] 拟除虫菊酯单克隆抗体;

- [0019] HRP标记的羊抗鼠酶标二抗；
- [0020] 间苯氧基苯甲酸标准品溶液；
- [0021] 碳酸盐缓冲液,0.1M,pH=9.6；
- [0022] 洗涤液PBST,0.01M,pH=7.4
- [0023] 底物TMB显色液,0.15mg/ml；
- [0024] 反应终止液,2mol/L H₂SO₄。
- [0025] 又一方面,本发明实施例提供了上述检测试剂在制备拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂盒中的应用。
- [0026] 再一方面,本发明实施例提供了一种拟除虫菊酯残留的ELISA检测方法,所述方法包括以下步骤：
- [0027] 用碳酸盐缓冲液将检测抗原稀释至1μg/ml,加入96孔酶标板,每孔加入100μL,4℃包被过夜；
- [0028] 向每孔中加入250μL洗涤缓冲液洗涤3-5次,弃洗涤液,拍干；
- [0029] 向96孔酶标板中加入枸杞样本50μl,拟除虫菊酯单克隆抗体50μl,加入空白对照,25℃反应30min；
- [0030] 向每孔中加入洗涤液洗涤3-5次,弃洗涤液,拍干；
- [0031] 向96孔酶标板每孔中加入用封闭液稀释1000倍的,HRP标记的羊抗鼠酶标二抗,每孔100μL,25℃避光反应30min；
- [0032] 向每孔中加入洗涤液并洗涤3-5次,弃洗涤液,拍干；
- [0033] 向96孔酶标板中加入酶底物TMB显色剂,每孔加入100μL,室温避光反应15min；
- [0034] 向96孔酶标板中加入终止液,每孔100μL,终止反应,用酶标仪在450nm波长下测定各孔吸光光度OD值；
- [0035] 结果判断:用磷酸盐缓冲液将间苯氧基苯甲酸标准品分别稀释成浓度为0,125,250,500,1000及2000ppb的五个不同浓度后检测OD值；
- [0036] 以间苯氧基苯甲酸标准品质量浓度以10为底的对数为横坐标,以质量浓度分别为125、250、500、1000、2000ppb的间苯氧基苯甲酸标准品溶液的吸光度与质量浓度为0ppb的标准品溶液的吸光度的比值为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,将枸杞样品中测得的吸光度值代入标准曲线,计算得枸杞中间苯氧基苯甲酸残留量。
- [0037] 与现有技术相比,本发明的有益效果是：
- [0038] 本发明针对目前检测农药残留方法存在检测时间长,操作复杂,使用不方便等技术问题,通过对枸杞中拟除虫菊酯类农药残留进行研究,采用了以拟除虫菊酯的单克隆抗体为主要检测试剂的ELISA检测方法,该方法检测枸杞中拟除虫菊酯类农药残留具有检测时间短,操作方便,成本低,特异性好,可检测出含有间苯氧基苯甲酸(PBA)结构的所有菊酯类农药残留。

附图说明

- [0039] 图1是本发明实施例1提供的免疫抗原与检测抗原的SDS-PAGE凝胶电泳图谱；
- [0040] 图2是本发明实施例3提供的标准间苯氧基苯甲酸的不同浓度与其对应吸光度的关系图。

具体实施方式

[0041] 为更进一步阐述本发明为达成预定发明目的所采取的技术手段及功效,以下以较佳实施例,对依据本发明申请的具体实施方式、技术方案、特征及其功效,详细说明如后。下述说明中的多个实施例中的特定特征、结构、或特点可由任何合适形式组合。

[0042] 表1. 本发明实验物质的中文与英文简写对照表

[0043]

符号说明表			
PBA	间苯氧基苯甲酸	TMB	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
NHS	N-羟基琥珀酰亚胺	EDC	1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐
Tris	三羟甲基氨基甲烷缓冲液	DMF	二甲基甲酰胺
PBS	磷酸盐缓冲液	BSA	牛血清蛋白
PBST	加 Tween-20 的磷酸盐缓冲液	OVA	鸡卵血清蛋白
DMSO	二甲基亚砷	CDI	N,N'-羰基二咪唑
SDS-PAGE	凝胶电泳	DMEN	基础培养液
PEG-4000	聚乙二醇-4000	HRP	辣根过氧化物酶蛋白保护剂
HT	次黄嘌呤和胸腺嘧啶嘌呤混合的杂交瘤细胞培养基添加剂	HAT	杂交瘤细胞培养基
FCA	弗氏完全佐剂	FIA	弗氏不完全佐剂
IC50	半抑制率	Carb/NH2-SPE	碳氨固相萃取柱
ELISA	酶联免疫吸附测定法		

[0044] 实施例1 (合成拟除虫菊酯人工抗原)

[0045] 试剂及材料如表2所示;

[0046] 表2实施例1的试剂与材料明细表

[0047]

试剂及材料	购买公司	试剂及材料	购买公司
冰乙酸	国药集团上海化学试剂总公司	EDTA	国药集团上海化学试剂总公司
丙三醇(甘油)	国药集团上海化学试剂总公司	氯化钠	国药集团上海化学试剂总公司
甲醇	国药集团上海化学试剂总公司	氯化钾	国药集团上海化学试剂总公司
EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)	Sigma	十二水合磷酸二氢钠	国药集团上海化学试剂总公司
NHS (N-羟基琥珀酰亚胺)	Sigma	磷酸二氢钾	国药集团上海化学试剂总公司
DCC	Sigma	BSA	Sigma
丁二酸酐	国药集团上海化学试剂总公司	OVA	Sigma
戊二醛	国药集团上海化学试剂总公司	亚硝酸钠	国药集团上海化学试剂总公司
甘氨酸	国药集团上海化学试剂总公司	盐酸	国药集团上海化学试剂总公司
Tris	国药集团上海化学试剂总公司	蛋白定量检测试剂盒	天根生化科技(北京)有限公司
氢氧化钠	国药集团上海化学试剂总公司 其余化学试剂为分析纯	考马斯亮蓝	Sigma

[0048] 试验仪器设备如表3所示；

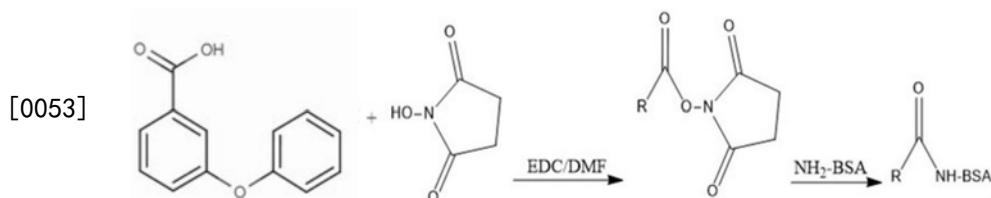
[0049] 表3实施例1的仪器设备明细表

[0050]

仪器名称	生产厂商	仪器名称	生产厂商
可调微量加样器	艾本德	精密电子天平	赛多利斯
酶联免疫分析仪	上海科华生物工程股份有限公司	恒温磁力搅拌器	上海司乐
CO ₂ 恒温培养箱	力辰	冰箱	海尔
低温/高速离心机	赛默飞世尔	高压灭菌锅	上海申安医疗器械厂
蛋白纯化仪	赛默飞世尔	超低温冰箱	赛默飞世尔
超净工作台	苏净		

[0051] 具体合成方法：

[0052] 采用碳二亚胺法(EDC法)将间苯氧基苯甲酸(PBA)和牛血清蛋白(BSA)偶联合成人工免疫抗原；反应过程如下：



[0054] 1. 碳二亚胺法具体操作步骤如下：

[0055] ①称取1mg PBA (间苯氧基苯甲酸)，溶于200 μ l DMF (二甲基甲酰胺)，预冷在冰中反应30分钟，加入0.56mg NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 和1.5mg的EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)，室温搅拌反应2h；有沉淀生成，1000r/min离心15分钟，去掉沉淀；

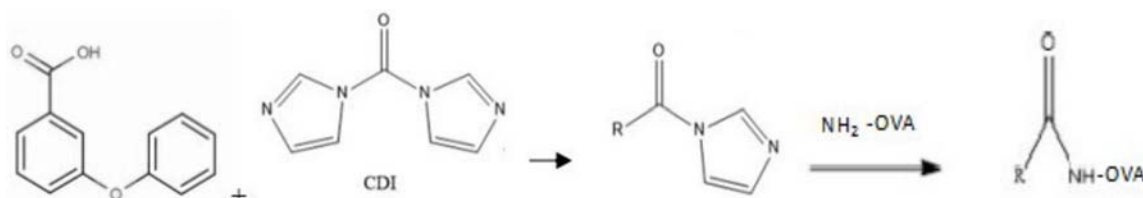
[0056] ②称取10mg BSA，溶于1ml pH8.0PBS (磷酸盐缓冲液)；

[0057] ③将溶液①逐滴加入溶液②中，室温搅拌反应2h；混合溶液在4℃条件下搅拌反应3h。将反应液装入透析袋中，用1 $\times$ PBS (pH=7.4) 透析3天。-20℃保存；

[0058] 2. 采用羰基二咪唑法 (CDI) 将间苯氧基苯甲酸和鸡卵清蛋白偶联合成检测抗原；

[0059] 反应过程如下：

[0060]



[0061] 羰基二咪唑法具体操作步骤如下：

[0062] ①称取1mg PBA，溶于200 μ l DMSO (二甲基亚砜)，加入CDI (N,N'-羰基二咪唑)，室温反应10min；有沉淀生成，1000r/min离心，去掉沉淀；

[0063] ②称取10mg OVA，溶于1ml 0.1M NaCO₃中，室温反应2h，充分混匀后4℃避光静置，反应过夜；

[0064] ③将溶液①逐渐滴加入溶于②中，室温反应2h；混合溶液在4℃条件下搅拌反应3h。将反应液装入透析袋中，用1 $\times$ PBS (pH=7.4) 透析3天，-20℃保存；

[0065] 3. 拟除虫菊酯类农药半抗原的鉴定过程：

[0066] 采用碳二亚胺法和羰基二咪唑法合成人工免疫抗原PBA-BSA及检测抗原PBA-OVA后，配制50mg/L的浓缩胶、100mg/L的分离胶，调节浓缩胶电压为70V，分离胶电压为90V，各孔上样量20 μ l，SDS-PAGE凝胶电泳后，考马斯亮蓝染色5-6小时，于脱色液中过夜脱色，依据蛋白条带位置的差异判断偶联效果。

[0067] 如图1所示，碳二亚胺法可以将间苯氧基苯甲酸 (PBA) 与牛血清白蛋白 (BSA) 偶联合成人工免疫抗原PBA-BSA，羰基二咪唑法也可将PBA与鸡卵白蛋白OVA偶联，得到PBA-OVA检测抗原，合成物经SDS-PAGE凝胶电泳鉴定 (图1)，PBA-BSA免疫抗原分子量大小约70kDA，合成成功的免疫抗原PBA-BSA分子量较BSA大，泳动速度比未结合间苯氧基苯甲酸 (PBA) 的牛血清白蛋白 (BSA) 稍慢，同样合成成功的PBA-OVA检测抗原分子量约40kDA，较OVA稍大，泳动速度比未结合间苯氧基苯甲酸 (PBA) 的鸡卵清蛋白 (OVA) 稍慢，SDS-PAGE凝胶电泳鉴定结果表明免疫抗原PBA-BSA与检测抗原PBA-OVA均已成功合成。

[0068] 实施例2 (合成拟除虫菊酯PBA通用抗体)

[0069] 试剂及材料如表4所示；

[0070] 表4实施例2的试剂与材料明细表

[0071]

试剂材料	购买公司	试剂材料	购买公司
BSA（牛血清蛋白）	Sigma	骨髓瘤细胞	实验室保存
OVA（鸡卵清蛋白）	Sigma	BALB/c 小鼠	扬州大学
小牛血清	四季青	96 孔细胞培养板	Corning
羊抗鼠酶标二抗	KPL	24 孔细胞培养板	Corning
双氧水	国药集团上海化学试剂总公司	6 孔细胞培养板	Corning
碳酸氢钠	国药集团上海化学试剂总公司	细胞培养皿	Corning
无水碳酸钠	国药集团上海化学试剂总公司	15ml 离心管	Corning
氯化钠	国药集团上海化学试剂总公司	50ml 离心管	Corning
氯化钾	国药集团上海化学试剂总公司	1ml 冻存管	NUNC
十二水合磷酸二氢钠	国药集团上海化学试剂总公司	DMSO	Sigma
磷酸二氢钾	国药集团上海化学试剂总公司	小鼠抗体亚型检测试剂盒	southernBiotech
柠檬酸	国药集团上海化学试剂总公司	PEG4000	Sigma
DMEM 培养基	Hyclone	HT	Sigma
弗氏完全佐剂	Sigma	HAT	Sigma
弗氏不完全佐剂	Sigma	胎牛血清	Sigma

[0072] 实验仪器设备如表5所示；

[0073] 表5实施例2的仪器设备明细表

[0074]

仪器名称	生产厂商	仪器名称	生产厂商
------	------	------	------

[0075]

可调微量加样器	艾本德	恒温磁力搅拌器	上海司乐仪器有限公司
酶联免疫分析仪	赛默飞世尔	冰箱	海尔公司
二氧化碳培养箱	赛默飞世尔	液氮罐	金凤科技有限公司
低速离心机	湖北湘仪仪器有限公司	倒置显微镜	麦克奥迪
高速离心机	赛默飞世尔	超净工作台	江苏苏净集团有限公司
精密电子天平	赛多利斯	倒置显微镜	上海精密仪器仪表有限公司

[0076] 具体合成方法：

[0077] 1. 用免疫抗原免疫小鼠，将其脾细胞与骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞：

[0078] 取6周龄雌性BALB/c小鼠四只，编号为1-4号，进行一周适应性饲养。于免疫前一

周,每只小鼠尾静脉采集阴性血液1mL,制备阴性血清。用PBA-BSA对四只小鼠进行免疫,共进行四次免疫,分别采取皮下多点注射和腹腔注射。每次每只小鼠抗原免疫用量为25 μ g,初次免疫用无菌PBS溶解的PBA-BSA抗原与等量的弗氏完全佐剂(FCA)混合后充分乳化,使用快速乳化机进行乳化10分钟,将乳化之后的液体滴加一滴到水中,呈球状不扩散时,表明乳化成功。第二次免疫用等量弗氏不完全佐剂(FIA)混合后充分乳化,每次免疫间隔28天,注射后10天进行尾部采血,检测效价。第三次免疫用等量生理盐水混合,腹腔注射进行冲击免疫,第四次免疫于融合前三天,用抗原直接加强免疫一次,剂量同前;具体免疫程序见表6;

[0079] 表6实施例2的小鼠免疫方案

[0080]

免疫次数	间隔天数	佐剂类型	免疫剂量(每只)	免疫部位及方式
第一次	28	弗氏完全佐剂	25 μ g	皮下多点注射
第二次	28	弗氏不完全佐剂	25 μ g	皮下多点注射
第三次	14	生理盐水	25 μ g	腹腔注射
第四次	融合前三天	抗原	25 μ g	腹腔注射

[0081] 2.小鼠抗体血清的效价测定:

[0082] 第二次免疫后10天尾静脉采血,分离血清,3000r/min离心5分钟,取部分上清液检测效价,剩余上清液4℃下保存备用。通过间接ELISA法测定小鼠抗体血清效价,以此确定是否有针对PBA的抗体生成。具体步骤如下:

[0083] a.用0.1M,pH=9.6的碳酸盐缓冲液稀释检测抗原至1 μ g/ml,加入96孔酶标板,每孔100 μ l,37℃反应3h。

[0084] b.甩去板孔中液体,加入250 μ l洗涤缓冲液,静置30s,甩去板中液体,重复3次。

[0085] c.加入抗体血清,每孔100 μ l,同时加入阳性对照(阳性小鼠血清,用封闭液倍比稀释)、阴性对照(免疫前小鼠血清)和空白对照(不加小鼠血清),37℃反应45min。

[0086] d.重复步骤b。

[0087] e.加入用封闭液稀释1000倍的HRP标记的羊抗鼠酶标二抗,每孔100 μ l,37℃反应45min。

[0088] f.重复步骤b。

[0089] g.加入酶底物TMB显色剂,每孔100 μ l,室温避光反应15min。

[0090] h.加入终止液(2mol/L的H₂SO₄),每孔100 μ l,终止反应,使用酶标仪在波长450nm读取OD值。

[0091] 结果判断:以待测孔OD 450nm值(P)≥空白OD 450nm值(N)的2.1倍,判为阳性,即P/N值≥2.1为阳性。选择效价最高,针对PBA特异性最强的小鼠用于细胞融合。

[0092] 3.建立抗拟除虫菊酯的单克隆抗体的杂交瘤细胞株:

[0093] 从液氮中取出冻存的骨髓瘤细胞,立即放入37℃水浴中融化复苏,在还没有完全融化时立即用75%酒精对管子外部消毒,转入超净台。吸取融化后的细胞液于离心管,500r/min离心3分钟,转入超净台,弃尽上清液,用少量完全培养液打散细胞团,加入完全培养基于冻存管中,用吸管吹打均匀,全部吸出转至细胞培养瓶中,置于37℃二氧化碳培养箱

中传代培养。待细胞长满瓶底后传至另一细胞瓶中培养,在倒置显微镜下观察其细胞状态,状态良好的细胞备做融合用。

[0094] 制备免疫脾细胞:取效价最高且加强免疫的小鼠,眼球摘除采血,分离血清作为检测时的阳性对照血清。将小鼠颈椎脱臼致死,将其浸泡于75%酒精瓶内消毒10分钟,之后用消毒钳将其移入超净工作台内,固定于解剖板上,用灭菌剪刀、镊子分别剪开左侧皮肤和腹膜,无菌取出脾脏置于已盛有基础培养液(DMEN)的无菌平皿中清洗,剥离被膜上的结缔组织。将脾脏移入另一盛有基础培养液的平皿内的滤膜中,用两个注射器上的弯针头将脾脏刺孔,然后其中一个弯针头固定滤膜,另一个弯针头挤压滤膜,使脾细胞完全释放到平皿中的基础培养液中。用无菌滴管吹打细胞制成单细胞悬液,收获脾细胞悬液。将平皿中脾细胞悬液转移到离心管中,离心,弃上清,用细胞培养液离心洗涤一次。

[0095] 细胞融合:用1ml 50%的PEG4000将分离得到的脾细胞与提前复苏备用的骨髓瘤细胞按5:1的比例混合到50ml的离心管中进行融合,离心,弃上清,用细胞培养液离心洗涤一次,离心管中加入20ml HAT细胞培养液并吹打成单细胞悬液,最后把混匀的杂交瘤细胞悬液每孔100 μ L铺入提前制备好饲养细胞的96孔培养板中,将细胞培养板置于温度37 $^{\circ}$ C, 5%的CO₂恒温培养箱中孵育。

[0096] 筛选阳性杂交瘤细胞:

[0097] 杂交瘤的培养:融合后第0-7天用HAT培养液培养,7-14天换用HT培养液培养。细胞融合7天后,培养板孔底长出肉眼可见的小集落,然后通过间接ELISA法对所有细胞孔进行初次筛选,记录呈现强阳性的细胞孔。对具有高吸光值的杂交瘤细胞孔进行筛选,筛选出能对半抗原PBA结合力强的孔,反复测定2-3次。对初筛呈阳性的各细胞孔应及时在细胞培养板中进行扩大培养和克隆化。

[0098] 克隆阳性杂交瘤细胞:采用有限稀释法,用移液枪将生长在细胞培养孔底部的阳性杂交瘤细胞进行连续吹打直至细胞混匀之后,用平板计数器对阳性杂交瘤细胞进行细胞计数,根据细胞计数结果对细胞悬液连续稀释至统计上每孔加样仅含单个细胞,转移至96孔板培养,若一板之中存在多孔阳性,则应选取有高吸光值且对半抗原PBA有很好的结合能力的杂交瘤细胞孔克隆,经过数次克隆化操作,直至所有克隆化细胞孔检测阳性率为100%时,即可停止克隆,选择形态圆润、透亮且处于生长对数期的杂交瘤细胞进行扩大培养,用冻存液(90%胎牛血清+10%DMSO)将细胞从培养瓶的底部吹吸下来,混匀后迅速移入冻存管,放进提前加有异丙醇的细胞冻存盒,放入超低温冰箱(-80 $^{\circ}$ C)过夜,梯度降温,待细胞冻结之后次日转入液氮中长期保存。

[0099] 4. 制备单克隆抗体:本法采用小鼠体内诱生法,方法如下:提前8天对10周龄健康的Ba1b/c雌性小鼠腹腔注射灭菌之后的液体石蜡,每只约0.5mL。将处于良好生长状态的杂交瘤细胞培养液悬浮混匀,对小鼠进行腹腔注射,注射后观察小鼠的身体状况,用手触摸皮肤有紧张感时,即可采集腹水。

[0100] 5. 纯化单克隆抗体:采用饱和硫酸铵沉淀法,将收集的腹水离心(2000r/min,5分钟),弃去脂肪层和细胞层,收集中间清亮腹水(置于-20 $^{\circ}$ C冰箱保存待用)用饱和硫酸铵沉淀法进行纯化;

[0101] 具体步骤如下:

[0102] ①配置饱和硫酸铵溶液,4 $^{\circ}$ C静置过夜;

[0103] ②取腹水与等体积的PBS混合,等体积的饱和硫酸铵溶液在磁力搅拌器作用下逐滴的慢慢的加入,为使充分沉降免疫球蛋白,需要在4℃的条件下过夜静置;

[0104] ③重复步骤②;

[0105] ④过夜的腹水蛋白抗体离心后用1L PBS溶解,以PBS为背景缓冲液大量换液透析,可溶性钙盐检测,直至透析外液无白色浑浊形成为止。将透析液收集-20℃保存。

[0106] 测定PBA效价与灵敏度:间接ELISA测定效价的具体步骤如下:

[0107] a.用0.1M,pH=9.6的碳酸盐缓冲液稀释检测抗原至1μg/ml,加入96孔酶标板,每孔100μl,37℃反应3h。

[0108] b.甩去板孔中液体,加入250μl洗涤缓冲液,静置30s,甩去板中液体,重复3次。

[0109] c.加入腹水单克隆抗体的稀释液,每孔100μl,同时加入阳性对照和空白对照,37℃反应45min。

[0110] d.重复步骤b。

[0111] e.加入用封闭液稀释1000倍的HRP标记的羊抗鼠酶标二抗,每孔100μl,37℃反应45min。

[0112] f.重复步骤b。

[0113] g.加入酶底物TMB显色剂,每孔100μl,室温避光反应15min。

[0114] h.加入终止液(2mol/L的H₂SO₄),每孔100μl,终止反应,使用酶标仪在波长450nm读取OD值。

[0115] 鉴定小鼠抗体亚型:使用Southernbiotech小鼠抗体亚型鉴定试剂盒,按照试剂盒的说明书进行操作,鉴定杂交瘤细胞上清,确定每株单抗的亚型。

[0116] 6.分析实验结果:采用弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂进行两次免疫后,以PBA-OVA作为检测抗原,检测由PBA-BSA免疫的4只小鼠的血清抗体效价,测定结果见表7,4只小鼠血清抗体效价均可达到 1×10^4 以上,将小鼠抗体血清稀释27000倍时,4只小鼠血清P/N值均高于2.444,其中3#与4#P/N值达10倍以上,将4只小鼠抗体血清稀释至81000倍,P/N值高于2.1的为3#与4#小鼠,其中以4#小鼠P/N值较大,为3.465,3#小鼠P/N值略小,为3.254,将4只小鼠抗体血清稀释至243000倍时,P/N值均低于2.1,故3#与4#小鼠抗体血清效价为1:81000,小鼠血清效价越高,越能得到高质量的单抗,由上述竞争抑制实验结果选4#小鼠脾细胞进行单克隆抗体制备中的融合细胞。

[0117] 表7小鼠血清竞争抑制效果测定

[0118]

	PBS	AG(3 μ g/ml)	PBS	AG(1 μ g/ml)	PBS	AG(1 μ g/ml)	PBS	AG(1 μ g/ml)
	1 [#]		2 [#]		3 [#]		4 [#]	
1:100	3.243	3.249	3.266	3.257	3.296	3.299	3.326	3.295
1:1000	3.197	2.145	2.97	2.797	3.237	3.188	3.305	3.259
1:3000	2.975	0.941	2.052	1.792	2.933	2.731	3.084	3.028
1:9000	2.207	0.346	0.758	0.594	2.093	1.737	2.594	2.268
1:27000	0.846	0.132	0.226	0.192	1.009	0.733	1.291	1.018
1:81000	0.291	0.073	0.089	0.08	0.291	0.231	0.452	0.35
1:243000	0.151	0.056	0.064	0.058	0.112	0.092	0.163	0.14
空白	0.106	0.054	0.055	0.058	0.082	0.071	0.112	0.101
P/N _{1:27000}	7.981	2.444	4.109	3.310	12.305	10.324	11.527	10.079
P/N _{1:81000}	2.745	1.352	1.618	1.379	3.549	3.254	4.036	3.465

[0119] 注:P/N为血清效价1:27000或1:81000时,待测孔OD 450nm值/空白 (NC) OD 450nm值;AG为PBA-OVA检测抗原与标准品 (PBA) 等浓度混合物。

[0120] 7. 建立单克隆抗体杂交瘤细胞株:

[0121] 采用4#小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合,如表8所示,2E9-A5-F5孔的吸光值为1.639;1G7-F6-G4孔的吸光值为1.54,1G7-F6-D1孔的吸光值为1.38,对具有高吸光值的杂交瘤细胞孔进行筛选,筛选出能对半抗原PBA结合力强的孔,反复测定2次。对初筛呈阳性的各细胞孔应及时在细胞培养板中进行扩大培养和克隆化。选择克隆化细胞孔抗体效价检测阳性率为100%,形态圆润、透亮且处于生长对数期的杂交瘤细胞1#、3#和4#进行亚型测定,并扩大培养制备腹水;获得分泌抗拟除虫菊酯类农药单克隆抗体的杂交瘤细胞株3株,分别为1:2E9-A5-F5 (2代表第二块融合板,E9代表为融合板上的第E行第9列,A5、F5同理代表亚克隆板上位置,2与3细胞株同理);2:1G7-F6-D1;3:1G7-F6-G4。

[0122] 表8. 杂交瘤细胞筛选结果

[0123]

4-1# (2E9A5)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.044	0.046	0.049	0.048	0.046	0.047	0.048	1.052	1.52	1.56	1.054	1.086
B	0.047	0.04	0.041	0.041	0.043	0.043	0.045	0.045	0.045	0.044	0.046	1.061
C	0.04	0.037	0.038	0.038	0.04	0.037	0.04	0.036	0.041	0.038	1.051	1.256
D	0.039	0.037	0.036	0.035	0.038	0.04	0.04	0.039	0.041	0.041	0.041	1.252
E	0.042	0.036	0.037	0.038	0.038	0.033	0.032	0.037	0.034	0.034	0.038	0.046
F	0.041	0.037	0.036	0.042	1.639	0.039	0.029	0.031	0.038	0.04	0.044	0.055
G	0.04	0.039	0.039	0.034	0.042	0.039	0.037	0.035	0.035	0.038	0.045	0.051
H	0.049	0.039	0.04	0.039	0.045	0.043	0.042	0.041	0.039	0.043	0.047	1.549
4-2# (1G7F6)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.053	0.048	0.044	0.042	0.044	1.43	0.046	0.045	0.044	0.049	0.056	0.07
B	0.047	0.042	0.041	0.037	0.04	0.046	0.04	0.037	0.044	0.041	1.53	0.061
C	0.042	0.036	0.039	0.036	0.038	0.04	0.038	0.036	0.044	0.043	0.051	0.066
D	1.38	0.039	0.034	0.038	0.04	0.041	0.039	1.36	0.035	1.36	0.044	0.061
E	0.055	0.037	0.038	0.036	1.37	0.035	0.036	0.044	0.04	0.04	1.47	0.053
F	0.046	0.035	0.034	0.042	0.039	0.034	0.041	0.042	0.04	1.48	0.05	0.063
G	0.045	0.039	0.033	1.54	0.037	0.041	0.038	0.035	0.036	0.043	0.053	0.071
H	0.057	1.46	0.044	1.46	0.045	0.044	0.044	1.44	0.044	0.047	0.06	1.597

[0124] 表9.复检阳性杂交瘤细胞的抑制实验结果

[0125]

编号	PBS	AG(1 μ g/ml)	PBS	AG(1 μ g/ml)	备注
1	2.13	2.126	1.626	0.402	对应二次亚克隆的 4-1#
2	2.023	2.04	1.329	0.964	
3	2.117	2.099	1.22	0.487	
4	2.52	2.48	1.258	0.293	对应二次亚克隆的 4-2#

[0126] 8.检测定株细胞株细胞上清:

[0127] 将获得分泌单克隆抗体的3株杂交瘤细胞株所分泌细胞液采用竞争抑制法检测抗体效价,检测结果见表10。3个杂交瘤细胞株在标准品使用浓度为3 μ g/ml与6 μ g/ml条件下均有抑制效果,上表中PBS列为效价,标(3 μ g/ml或6 μ g/ml)列为抑制率,抑制率越低,效价越好,因此细胞2、3抑制效果较好,2#细胞抑制效果更好,并且细胞2与细胞3属于同一母克隆。目前初步定株细胞株3株,3个单克隆抗体均有一定竞争抑制效果,后续样本验证使用的为2#细胞。

[0128] 表10定株细胞上清液抗体竞争抑制效果检测

[0129]

编号	A	PBS	标 (3 μ g/ml)	B	PBS	标 (6 μ g/ml)
1	1	2.645	2.151	1	2.686	1.676
	1: 50	0.905	0.189	1: 50	0.966	0.169
2	1	2.42	0.433	1	2.37	0.24
	1: 50	0.24	0.126	1: 50	0.225	0.096
3	1	2.495	0.511	1	2.466	0.324
	1: 50	0.363	0.11	1: 50	0.381	0.155

[0130] 表11小鼠腹水蛋白抗体竞争抑制效果检测结果

[0131]

细胞株		稀释倍数							空白
		100	1000	3000	9000	27000	81000	243000	
1#	PBS	3.192	3.351	3.094	2.785	1.175	0.513	0.245	0.235
	标准品 1 μ g/ml	3.264	3.144	2.581	1.137	0.369	0.126	0.066	0.182
	标准品 3 μ g/ml	3.239	2.812	1.596	0.567	0.162	0.069	0.049	0.119
	标准品 6 μ g/ml	3.215	2.316	1.023	0.327	0.109	0.057	0.049	0.081
2#	PBS	3.388	3.486	3.278	3.062	2.265	1.16	0.469	0.345
	标准品 1 μ g/ml	3.428	3.352	2.859	1.956	0.84	0.465	0.299	0.264
	标准品 3 μ g/ml	3.378	3.107	2.421	1.103	0.454	0.297	0.245	0.238
	标准品 6 μ g/ml	3.364	2.861	1.773	0.651	0.325	0.271	0.213	0.176
3#	PBS	3.166	3.266	2.924	2.078	0.633	0.181	0.07	0.101
	标准品 1 μ g/ml	3.223	2.796	1.475	0.47	0.131	0.06	0.05	0.111
	标准品 3 μ g/ml	3.141	1.834	0.654	0.198	0.082	0.055	0.049	0.107
	标准品 6 μ g/ml	3.032	1.356	0.487	0.168	0.095	0.077	0.07	0.162

[0132] 在表11中,小鼠的腹水蛋白抗体检测中,1#、2#与3#细胞分别在9000、27000和3000的稀释倍数下的抑制率接近IC₅₀,因此这三个细胞的小鼠腹水蛋白效价分别为9000、27000及3000。

[0133] 9. 上述单克隆抗体效价及亚型鉴定:

[0134] 腹水诱导法大量制备单克隆抗体并经纯化鉴定后通过测定抗体效价及亚型,其培养腹水抗体效价为1:256000,其抗体亚型为IgG 1,如表12、13所示。

[0135] 表12 3个细胞抗体效价检测值

[0136]

编号	1	2	3
100	2.76	2.852	2.776
1000	2.858	2.814	2.827
4000	2.74	2.706	2.71
16000	2.649	2.564	2.472
64000	2.458	2.173	1.989
256000	1.901	1.125	0.987
1024000	0.818	0.484	0.435
阴性	0.102	0.126	0.129
P/N ₂₅₆₀₀₀	18.637	8.929	7.651
P/N ₁₀₂₄₀₀₀	8.019	3.841	3.372

[0137] 表13抗体亚型测定结果

亚型	2E9-A5-F5	1G7-F6-D1	1G7-F6-G4
	1	2	3
IgG1	1.133	1.081	1.051
IgG2a	0.11	0.088	0.118
IgG2b	0.142	0.164	0.114
IgG3	0.14	0.11	0.11
IgA	0.113	0.097	0.127
IgM	0.092	0.068	0.148
Igκ	0.722	0.626	0.626
Igλ	0.11	0.114	0.101

[0138] [0139] 表12中,P/N₂₅₆₀₀₀与P/N₁₀₂₄₀₀₀均大于2.1,最低值为3.372,最高值达到18.637,为了进一步提高试验的准确性我们升高了一个梯度,选择1:256000的抗体效价进行后后续试验。采用腹水诱导法大量制备单克隆抗体并经纯化鉴定后通过小鼠抗体亚型检测试剂盒测定抗体亚型,在表13中的8种抗体亚型,细胞2E9-A5-F5、1G7-F6-D1和1G7-F6-G4亚型测定结果分别为1.133、1.081和1.051,以IgG 1的量最高,因此可以确定最终的抗体亚型为IgG 1。

[0140] 实施例3 (采用ELISA法检测枸杞中菊酯类物质)

[0141] 试剂与样品:

[0142] 乙腈、二氯甲烷:色谱纯;氯化钠、甲苯:优级纯;无水硫酸钠:分析纯;丙酮、正己烷:分析纯;PBA通用抗体(实施例2制备的单克隆抗体);Carb/NH₂-SPE柱6ml。高效氟氯氰菊酯农药,氯氰菊酯农药,氰戊菊酯农药,溴氰菊酯农药,甲氰菊酯农药均购自宁夏伟鑫博生物有限公司;氯氰菊酯标准品,氰戊菊酯标准品,溴氰菊酯标准品均购自上海安谱实验科技

有限公司;ELISA检测中所用试剂同前。

[0143] 材料为枸杞:2016年7月购自宁夏中宁县枸杞交易市场。

[0144] 仪器:万分之一天平;均质器;旋转蒸发仪;1ml移液器。ELISA检测中所用仪器同前;

[0145] 实验方法:采用PBA通用抗体通过竞争抑制ELISA法检测枸杞中农药残留量。

[0146] 1.制备农药供试品溶液及选择检测浓度:

[0147] 分别取溴氰菊酯(农药1,25g/L),甲氰菊酯(农药2,20%),氟氯氰菊酯(农药3,50g/L),氰戊菊酯(农药4,20%),高效氟氯氰菊酯(农药5,25g/L),顺式氯氰菊酯(农药6,50g/L)用PBS以50,500,5000以及50000的稀释倍数进行稀释,采用竞争抑制ELISA法检测吸光度(2次重复),选择吸光度接近于1的稀释倍数作为农药供试品溶液制备的最佳稀释倍数,采用RIDAWIN数据分析软件,计算农药1~农药6原液中PBA含量(ppm)。

[0148] 制备标准品溶液:用PBS将标准品PBA分别稀释成浓度为0,125,250,500,1000及2000ppb的五个不同浓度后检测OD值。

[0149] 采用竞争抑制ELISA法对PBA标准品进行检测,操作步骤如下:

[0150] ①用0.1M的碳酸盐缓冲液将PBA-OVA蛋白稀释至1μg/ml,每孔100μl,4℃包被过夜;

[0151] ②洗板3-5次,拍干,PBA标准品50μl,抗体50μl,充分混匀,25℃反应30min;

[0152] ③洗板3-5次,拍干,加入鼠二抗,25℃避光反应30min;

[0153] ④洗板3-5次,拍干,加入显色剂,25℃避光反应15min;

[0154] 加入100μl终止液,OD450读取OD值。

[0155] 2.绘制标准曲线:以PBA标准品质量浓度(ppb)以10为底的对数为横坐标,以质量浓度分别为125、250、500、1000、2000(ppb)的PBA标准品溶液的吸光度(B)与质量浓度为0的标准品溶液吸光度(B₀)的比值(B/B₀)为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程。

[0156] 3.采用PBA通用抗体检测上述六种农药:采用竞争抑制ELISA法对农药样本进行检测,具体方法同上述过程;

[0157] 4.采用PBA通用抗体检测三份枸杞样品农药残留量,采用竞争抑制ELISA法,具体步骤如下:

[0158] ①枸杞样本前处理

[0159] a.提取

[0160] 粉碎冷冻干燥枸杞,称取制备好的样品10.00g于100mL离心管中,加入15mL水浸泡30min,再加入40mL乙腈,高速匀浆2min,加入5g氯化钠,振摇1min后,于4000r/min离心5min。分取提取液10mL,浓缩近干,待净化。

[0161] b.净化

[0162] 用乙腈:甲苯(3:1,v/v)5mL预淋Carb/NH₂-SPE柱,近干时,用2mL乙腈:甲苯(3:1,v/v)将浓缩试样转入柱中,重复3次,再用20mL乙腈:甲苯(3:1,v/v)洗脱并收集,于旋转蒸发仪浓缩干,2.5mL丙酮定容,待测。

[0163] ②竞争抑制ELISA法具体操作步骤

[0164] a.用碳酸盐缓冲液将PBA-OVA蛋白稀释至1μg/ml,每孔100μl,4℃包被过夜;

[0165] b.洗板3-5次,拍干,枸杞样本50μl,抗体50μl,充分混匀,25℃反应30min;

[0166] c.洗板3-5次,拍干,加入鼠二抗,25℃避光反应30min;

[0167] d.洗板3-5次,拍干,加入显色剂,25℃避光反应15min;

[0168] e.加入100μl终止液,OD450读取OD值。

[0169] 4.农药交叉反应率:特异性可以通过交叉反应率表示。以不同浓度的溴氰菊酯,甲氰菊酯,氟氯氰菊酯,氰戊菊酯,高效氟氯氰菊酯,顺式氯氰菊酯作为竞争抗原,利用间接竞争ELISA法进行检测,交叉反应率为PBA标准品 IC_{50} 与结构类似物 IC_{50} 的比值(IC_{50} 是抑制率为50%的吸光度时的菊酯标准品浓度)。

[0170] 5.根据PBA通用抗体标准品PBA的检测结果绘制ELISA标准曲线,如图2所示:分别测定质量浓度为0、125、250、500、1000、2000(ppb)的PBA标准品溶液的吸光度,并绘制标准曲线,得到回归方程 $y = -44.652x + 169.05$, $R^2 = 0.9926$,其中x取值范围为2.097~3.301($\lg 125 \sim \lg 2000$)。

[0171] 6.PBA通用抗体检测6种农药结果:

[0172] 农药供试品溶液检测浓度需稀释倍数实验结果见表14,通过2次重复试验,农药1~农药6的检测浓度的稀释倍数分别为:5000,50000,5000,50000,500,5000,采用RIDAWIN数据分析软件,输入标品浓度、样本稀释度及相应的重复数、稀释比例,直接得出相应农药1~农药6原液中PBA含量,见表15,分别为2536ppm、16292ppm、2168ppm、8490ppm、256ppm、4451ppm,由表14可知,PBA通用抗体可以检测出菊酯类农药。

[0173] 表14.PBA通用抗体检测6个农药样本结果

[0174]

样本稀释度		农药 OD					
		溴氰菊酯	甲氰菊酯	氟氯氰菊酯	氰戊菊酯	高效氟氯氰菊酯	顺式氯氰菊酯
50000	OD1	2.299	1.383	2.243	1.678	2.297	2.012
	OD2	2.066	1.289	2.099	1.592	2.185	1.958
5000	OD1	1.145	0.28	1.211	0.285	1.807	0.861
	OD2	1.12	0.275	1.199	0.273	1.768	0.889
500	OD1	0.554	0.098	0.498	0.14	1.117	0.446
	OD2	0.532	0.098	0.508	0.14	1.14	0.42
50	OD1	0.409	0.095	0.273	0.13	0.41	0.311
	OD2	0.424	0.1	0.29	0.135	0.408	0.327

[0175] 表15.PBA通用抗体检测六种农药结果

[0176]

农药 编号	样本		稀释		检测	交叉率
	样本名称	原浓度 ppm	稀释比	稀 释 后 浓 度 ppm	原液 PBA 浓 度 ppm	
1	溴氰菊酯 25g/L	25000	5000	5	2536	10.1%
2	甲氰菊酯 20%	200000	50000	4	16292	8.1%
3	氟氯氰菊酯 50g/L	50000	5000	10	2168	4.3%
4	氰戊菊酯 20%	200000	50000	4	8490	4.2%
5	高效氟氯氰菊酯 25g/L	25000	500	50	256	1.0%
6	顺式氯氰菊酯 50g/L	50000	5000	10	4451	8.9%

[0177] 农药交叉率结果分析：

[0178] 特异性可以通过交叉反应率表示。以不同浓度的溴氰菊酯，甲氰菊酯，氟氯氰菊酯，氰戊菊酯，高效氟氯氰菊酯，顺式氯氰菊酯作为竞争抗原，利用间接竞争ELISA法进行检测，交叉反应率为PBA标准品 IC_{50} 与结构类似物 IC_{50} 的比值。单抗的交叉反应率表示单抗与竞争物结合的结构特异性，是判断单抗质量的重要化学参数。从表15可看出，通用单抗与农药溴氰菊酯的交叉反应率为10.1%，与GTP和GMP等其他结构类似物交叉反应率均小于10%。说明菊酯类农药通用抗体特异性良好。

[0179] 7. PBA通用抗体对枸杞样品中菊酯类农药检测结果：

[0180] 提取枸杞中菊酯类农药，使用PBA通用抗体，采用竞争抑制ELISA法测定三份枸杞样品中含有PBA结构的农药残留量分别为0.6556ppm、0.5896ppm、0.4974ppm。

[0181] 以上公开的仅为本发明的具体实施方式，但本发明的保护范围并不局限于此，任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内，可轻易想到变化或替换，都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此，本发明的保护范围应以上述权利要求的保护范围为准。

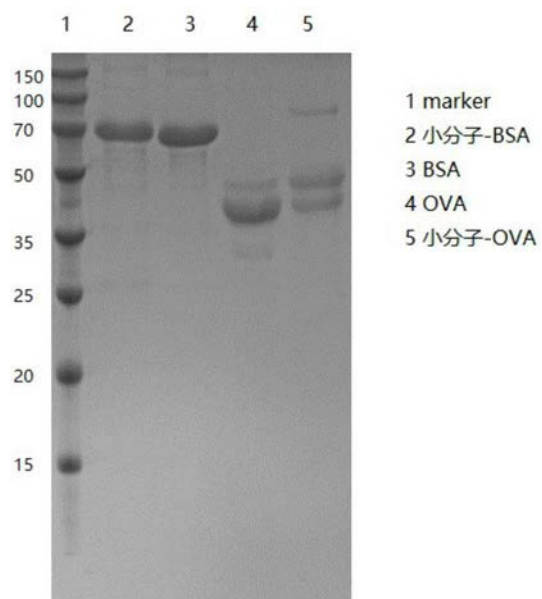


图1

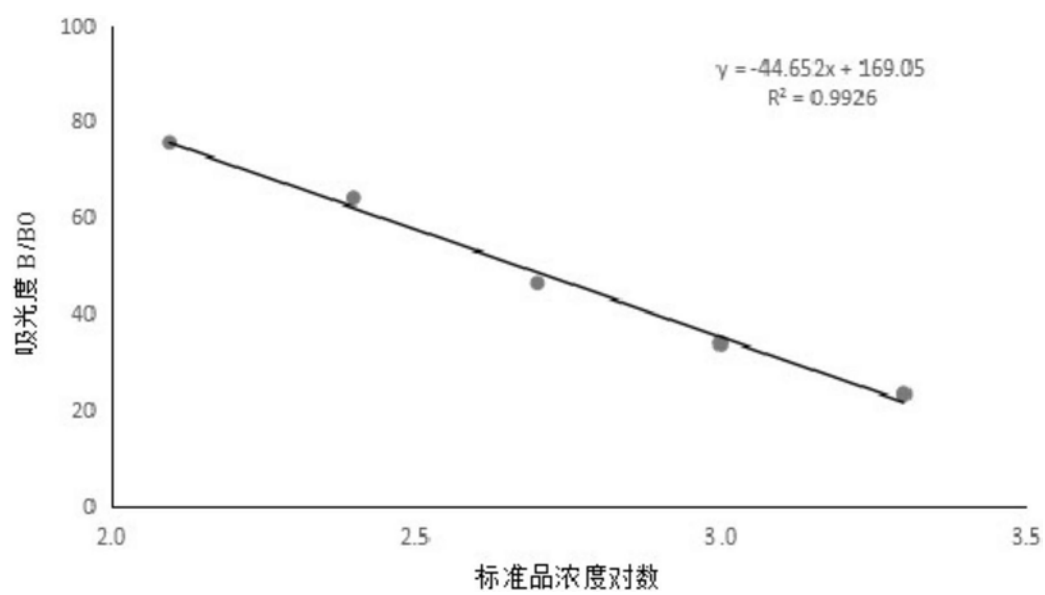


图2

专利名称(译)	拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂、试剂盒、应用及检测方法		
公开(公告)号	CN107505467A	公开(公告)日	2017-12-22
申请号	CN2017110587465.5	申请日	2017-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	宁夏医科大学		
申请(专利权)人(译)	宁夏医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	宁夏医科大学		
[标]发明人	赵云生 殷玉洁 董美娟 毛福英 高晓娟 张新慧 付雪艳 王建寰 赵建军		
发明人	赵云生 殷玉洁 董美娟 毛福英 高晓娟 张新慧 付雪艳 王建寰 赵建军		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/543 G01N2430/12		
代理人(译)	董芙蓉		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂、试剂盒、应用及检测方法，涉及化学检测技术领域。本发明的拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂包括拟除虫菊酯的单克隆抗体。本发明的拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂盒的检测试剂为所述拟除虫菊酯的单克隆抗体。本发明的检测试剂在制备拟除虫菊酯残留的ELISA检测试剂盒中的应用。利用本发明的ELISA检测试剂具有较好的特异性，灵敏度高，可检测出枸杞中含有间苯氧基苯甲酸(PBA)结构的所有菊酯类农药残留；本发明的ELISA检测方法操作方便，可快速检测出枸杞中菊酯类农药残留。

