



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109696548 A

(43)申请公布日 2019. 04. 30

(21)申请号 201710990416.6

(22)申请日 2017.10.23

(71)申请人 北京维德维康生物技术有限公司

地址 100095 北京市海淀区北清路156号环
保示范园9号院3号楼

(72)发明人 马立才 聂靖东 刘薇 邢维维
吴雨洋

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

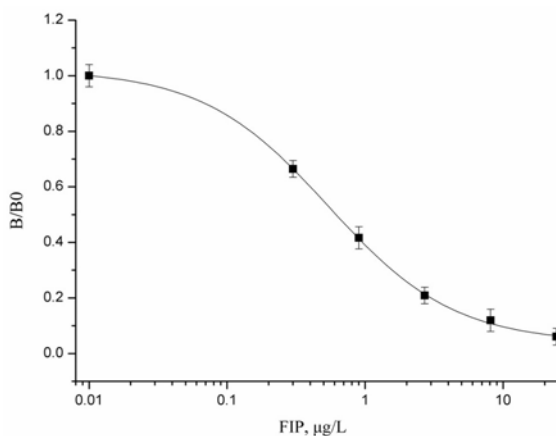
权利要求书2页 说明书12页 附图1页

(54)发明名称

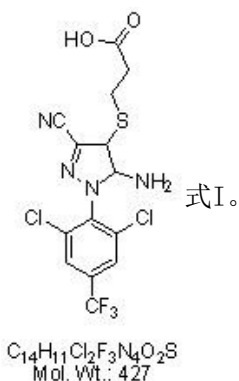
一种检测氟虫腈的试剂盒及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种检测氟虫腈的试剂盒及其制备方法与应用。本发明所提供的氟虫腈检测试剂盒包括氟虫腈酶标板、氟虫腈标准品工作液、氟虫腈抗体工作液、酶标记物工作液、底物液、终止液,还包括式I所示的氟虫腈半抗原与载体蛋白偶联所得的抗原。本发明所提供的氟虫腈检测试剂盒,操作简单、快速,灵敏度高、特异性强、准确性强,对于畜禽产品中氟虫腈残留快速

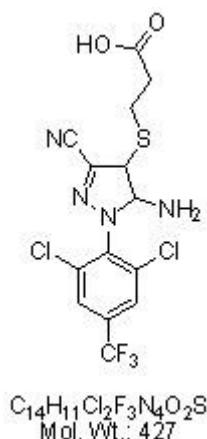


检测具有重大价值。



1. 一种氟虫腴的检测试剂盒, 包括: 氟虫腴酶标板、氟虫腴标准品工作液、氟虫腴抗体工作液、酶标记物工作液、底物液、终止液, 其特征在于:

所述氟虫腴酶标板由氟虫腴抗原包被制成, 所述氟虫腴抗原是由氟虫腴半抗原与载体蛋白偶联所得的抗原, 氟虫腴半抗原为式I所示化合物:



式I。

2. 根据权利要求1所述的一种氟虫腴的检测试剂盒, 其特征在于, 所述化合物为氟虫腴和巯基丙酸反应得到的, 该半抗原含有活性羧基, 可以与载体蛋白偶联形成包被原和免疫原。

3. 根据权利要求1所述的一种氟虫腴的检测试剂盒, 其特征在于, 所述化合物的制备方法包括如下步骤: 将50ml圆底烧瓶冲洗干净, 用乙醇吹干, 将其固定在搅拌器上; 称取原料1g, 用10ml甲醇溶解, 呈黄色, 搅拌, 加入365mg 3-巯基丙酸, 搅拌, 点板检测反应, 纯化, 柱层析纯化, 收集产物点所在溶液, 旋干, 即得氟虫腴半抗原。

4. 根据权利要求1所述的一种氟虫腴的检测试剂盒, 其特征在于, 所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白、血蓝蛋白、鼠血清蛋白、甲状腺蛋白或兔血清蛋白。

5. 根据权利要求1所述的一种氟虫腴的检测试剂盒, 其特征在于, 所述氟虫腴抗原的制备方法包括如下步骤:

(1) 将所述氟虫腴半抗原(式I)溶解于二甲基甲酰胺中, 然后加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺, 20-25℃磁力搅拌反应2-3h, 得到溶液I;

其中, 所述氟虫腴半抗原(式I)、所述二甲基甲酰胺、所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、所述N-羟基琥珀酰亚胺的配比为15.93mg:1.5mL:21.5mg:13mg;

(2) 将所述载体蛋白置于0.1M碳酸氢钠缓冲液中, 200rpm搅拌10min, 充分溶解, 得到溶液II; 所述载体蛋白与所述0.1M碳酸氢钠缓冲液的配比为33.6-50mg:3.5mL;

(3) 将所述溶液I和所述溶液II混合, 具体为在0-4℃条件下, 1000rpm搅拌下, 将溶液I逐滴加入到所述溶液II中, 500rpm搅拌反应24h, 得到溶液III;

(4) 用磷酸盐缓冲液(0.01M PBS, pH7.2), 于4℃对所述溶液III搅拌透析3天, 得到所述氟虫腴抗原。

6. 一种氟虫腴的检测试剂盒的制备方法, 其特征在于:

(1) 试剂盒中所述氟虫腴标准品溶液的浓度分别为0 μg/L、0.3 μg/L、0.9 μg/L、2.7 μg/L、8.1 μg/L和 24.3 μg/L;

(2) 试剂盒中所述氟虫腈酶标板;

(3) 试剂盒中所述氟虫腈抗体工作液,为抗体稀释液将抗体进行1:8000稀释,抗体稀释液为含6%,山羊血清的0.2MPBS;

(4) 试剂盒中所述酶标记物工作液,为经辣根过氧化酶标记的羊抗鼠的抗体;

(5) 试剂盒中所述样品稀释液,为 $20\times(0.03\text{ mol/L}-0.05\text{ mol/L})$ 的磷酸盐缓冲液;

(6) 所述试剂盒中所述洗涤液,由终浓度为0.8%~1.2%的吐温20、终浓度为0.5%叠氮化钠的组成,溶剂为0.01 M磷酸盐缓冲液;所述终浓度为各物质在洗涤液中的浓度;所述洗涤液的pH值为7.40.01M pH7.4的PBST溶液;

(7) 试剂盒中所述底物液包括由A液和B液组成, A液为终浓度为1.5%-2.5%的过氧化脲的水溶液,所述终浓度为过氧化脲在所述A液中的浓度;B液为终浓度为0.5%-1.5%的四甲基联苯胺的水溶液,所述终浓度为四甲基联苯胺在所述B液中的浓度;

(8) 终止液:1瓶(7mL),为2 M H_2SO_4 溶液。

7. 根据权利要求1或6所述的氟虫腈检测试剂盒的应用,其特征在于检测样本可以为组织、内脏、肉制品、牛奶、鸡蛋,所述检测上述样本中氟虫腈的检测限为 $1\mu\text{g/L}$ 。

一种检测氟虫腈的试剂盒及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于药物残留快速检测领域,涉及一种检测氟虫腈的试剂盒及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 氟虫腈是一种苯基吡唑类杀虫剂、杀虫谱广,用于防治地面和地下害虫、茎叶处理和土壤处理、种子处理等。其作用机制在于阻碍昆虫 γ -氨基丁酸控制的氯化物代谢,因此对蚜虫、叶蝉、飞虱、鳞翅目幼虫、蝇类和鞘翅目等重要害虫有很高的杀虫活性,是被众多农药专家推荐为代替高毒有机磷农药的首选品种之一,近年来,氟虫腈也广泛用于卫生杀虫剂,主要用于防杀蟑螂、蚂蚁等有害生物。

[0003] 虽然氟虫腈防治害虫效果很好,但是其对环境极其不友好,会对农作物周围的蝴蝶、蜻蜓等造成影响,对鱼、虾、蜜蜂、家蚕高毒。并且现有动物实验研究表明,短期摄取大量氟虫腈会对神经系统造成不良影响,长期摄取氟虫腈可能会损害肝脏、甲状腺和肾脏。因此我国规定2009年10月1日起禁用氟虫腈,目前仅可用于家庭卫生害虫。欧盟法律也规定,氟虫腈不得用于人类食品产业链的畜禽养殖过程。

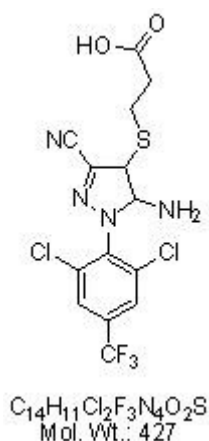
[0004] 然而,2017年7月20日,比利时通过RASFF系统通报鸡蛋中检出氟虫腈。问题鸡蛋已被销往12个国家或地区。据报道,问题鸡蛋产自荷兰,氟虫腈被不恰当的用于养鸡场的清洁物品中,造成鸡蛋被检出残留物。此次事件说明,农药污染贯穿产品养殖、生产、加工、销售流通等各个环节,对于政府后续监管提出了更严峻的考验。“十三五”规划中也提到从农田到餐桌全链条监管,实现食用农产品全过程追溯管理。

[0005] 而影响政府监管或管理效果最重要的因素是对氟虫腈的检测手段,目前氟虫腈的检测还主要是针对蔬菜、环境中的杀虫剂氟虫腈检测,方法主要有高效液相法和液相色谱质联用法,这些方法特异性强、灵敏度高,但是操作繁琐、仪器昂贵,不适用于大批量样品的筛选检测。免疫检测法在抗原抗体的定性定量方面具有独特的优势,其操作简便快速、成本低、分析样本量大,但现有的免疫检测的样本未能覆盖到养殖加工环节,而且灵敏度不能达到对于氟虫腈监测的要求。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种检测氟虫腈的试剂盒及其制备方法与应用,具有灵敏度高、准确性强、灵敏度高、操作简便的优点,特别适用于牛、羊、猪、鸡等动物的可食组织、内脏、鸡蛋、牛奶、动物产品中氟虫腈残留快速检测。

[0007] 本发明的一个目的是提供一种氟虫腈半抗原化合物,其结构式如式I所示:



(式I)。

[0008] 氟虫腴半抗原是氟虫腴和巯基丙酸反应得到的,该半抗原含有活性羧基,可以与载体蛋白偶联形成包被原和免疫原。

[0009] 上述式I所示化合物与载体蛋白的偶联物也属于本发明的保护范围。其中,所述载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、鼠血清蛋白(MSA)、甲状腺蛋白(BCG)、兔血清蛋白(RSA)、血蓝蛋白(KLH)或卵清白蛋白(OVA)。

[0010] 所述氟虫腴半抗原与载体蛋白的偶联物是指氟虫腴半抗原与载体蛋白通过活性酯法得到的产物。

[0011] 上述式I所示化合物和/或上述式I所示化合物与载体蛋白的偶联物在制备氟虫腴单克隆抗体中的应用也属于本发明的保护范围。

[0012] 上述式I所示化合物、上述式I所示化合物与载体蛋白的偶联物和/或上述氟虫腴单克隆抗体在制备检测氟虫腴的酶联免疫试剂盒中的应用也属于本发明的保护范围。

[0013] 本发明的另一个目的是提供一种制备上述式I所示化合物的方法和一种制备上述式I所示化合物与载体蛋白的偶联物的方法。

[0014] 本发明所提供的制备上述式I所示化合物的方法,包括如下步骤:将氟虫腴、3-巯基丙酸以1000:365的重量比溶于甲醇中,纯化,旋干,终止反应,得到所述化合物。

[0015] 本发明所提供的制备上述式I所示化合物与载体蛋白的偶联物的方法,包括如下步骤:

1) 将所述氟虫腴半抗原(式I)溶解于二甲基甲酰胺(DMF)中,然后加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),20-25℃磁力搅拌反应2-3h,得到溶液I;

其中,所述氟虫腴半抗原(式I)、所述二甲基甲酰胺(DMF)、所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、所述N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的配比为15.93mg:1.5mL:21.5mg:13mg。

[0016] 2) 将所述载体蛋白置于0.1M碳酸氢钠缓冲液中,200rpm搅拌10min,充分溶解,得到溶液II;所述载体蛋白与所述0.1M碳酸氢钠缓冲液的配比为33.6-50mg:3.5mL;

其中,若所述载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA),则所述牛血清白蛋白(BSA)与所述0.1M碳酸氢钠缓冲液的配比为50mg:3.5mL;若所述载体蛋白为卵清蛋白(OVA),则所述卵清蛋白(OVA)与所述0.1M碳酸缓冲液的配比为33.6mg:3.5mL;

3) 将所述溶液I和所述溶液II混合,具体为在0-4℃条件下,1000rpm搅拌下,将溶液I逐滴加入到所述溶液II中,500rpm搅拌反应24h,得到溶液III;

4) 用磷酸盐缓冲液(0.01M PBS, pH7.2),于4℃对所述溶液III搅拌透析3天,得到所述氟虫腈抗原。

[0017] 所述氟虫腈半抗原(式I)或所述氟虫腈抗原在定性或定量检测氟虫腈中的应用也属于本发明的保护范围。

[0018] 称取 1 ± 0.05 g 均质后的样品于50mL 离心管中;依次加入1 g 纯化试剂、3 mL 乙腈(分析纯),充分涡动5 min;4000 g 以上,离心5 min;取1 mL 上清液于干净离心管中;50-60℃水浴氮气吹干;加入1 mL 样品稀释液,充分涡动1 min;即得检测溶液。

[0019] 本发明的还提供了一种检测氟虫腈的酶联免疫试剂盒。

[0020] 本发明所提供的检测氟虫腈的酶联免疫试剂盒,为下述1)、2)、3)或4)中任一所述酶联免疫试剂盒:

1) 酶联免疫试剂盒中包括上述任一所述式I所示化合物与载体蛋白的偶联物、上述氟虫腈单克隆抗体和酶标记抗抗体;其中,所述偶联物作为包被原;

2) 酶联免疫试剂盒中包括上述式I所示化合物的酶标记物、上述氟虫腈单克隆抗体和抗抗体;其中,所述抗抗体作为包被原;

3) 酶联免疫试剂盒中包括上述式I所示化合物的酶标记物、上述氟虫腈单克隆抗体;其中,所述氟虫腈单克隆抗体作为包被原;

4) 酶联免疫试剂盒中包括上述任一所述式I所示化合物与载体蛋白的偶联物、上述氟虫腈单克隆抗体的酶标记物;其中,所述偶联物作为包被原。

[0021] 上述4种试剂盒的检测原理如下:

当在酶标板微孔条上预包被氟虫腈半抗原与载体蛋白的偶联物时,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入氟虫腈单克隆抗体溶液,样本中残留的氟虫腈或氟虫腈标准品与酶标板上包被的氟虫腈半抗原与载体蛋白的偶联物竞争氟虫腈单克隆抗体,加入酶标记二抗进行放大作用,用显色液显色,样本吸光值与样本中氟虫腈的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中氟虫腈的含量。同时也可根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度氟虫腈标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中氟虫腈含量的浓度范围。

[0022] 当在酶标板微孔条上预包被二抗时,加入氟虫腈单克隆抗体孵育后,加入样本溶液或标准品溶液,再加入酶标记氟虫腈半抗原溶液,样本中的氟虫腈或氟虫腈标准品与酶标记氟虫腈半抗原竞争氟虫腈特异性抗体,用显色液显色,样本吸光度值与样本中氟虫腈的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中氟虫腈的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅,与系列浓度氟虫腈标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中氟虫腈含量的浓度范围。

[0023] 当在酶标板微孔条上预包被氟虫腈单克隆抗体时,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入酶标记氟虫腈半抗原溶液,样本中残留的氟虫腈或氟虫腈标准品与酶标记抗原竞争包被在酶标板上的氟虫腈单克隆抗体,用显色液显色,样本吸光值与氟虫腈的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中氟虫腈的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅,与系列浓度的氟虫腈标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中氟虫腈含量的浓度范围。

[0024] 当在酶标板微孔条上预包被氟虫腈半抗原与载体蛋白的偶联物时,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入酶标记氟虫腈单克隆抗体溶液,样本中的氟虫腈或氟虫腈标准品与酶标板上包被的氟虫腈抗原竞争氟虫腈单克隆抗体,用显色液显色,样本吸光值与样本中氟虫腈的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中氟虫腈的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅,与系列浓度氟虫腈标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中氟虫腈含量的浓度范围。

[0025] 上述任一所述试剂盒中还可包括氟虫腈标准品溶液、显色液、洗涤液和/或样品稀释液。

[0026] 上述任一所述试剂盒中,所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体。

[0027] 上述任一所述试剂盒中,所述氟虫腈标准品溶液的浓度分别为0 $\mu\text{g/L}$ 、0.3 $\mu\text{g/L}$ 、0.9 $\mu\text{g/L}$ 、2.7 $\mu\text{g/L}$ 、8.1 $\mu\text{g/L}$ 和 24.3 $\mu\text{g/L}$ 。

[0028] 上述任一所述试剂盒中,所述底物显色液由A液和B液组成, A液为终浓度为1.5%–2.5%的过氧化脲的水溶液,所述终浓度为过氧化脲在所述A液中的浓度;B液为终浓度为0.5%–1.5%的四甲基联苯胺的水溶液,所述终浓度为四甲基联苯胺在所述B液中的浓度。

[0029] 上述任一所述试剂盒中,所述洗涤液由终浓度为0.8%~1.2%的吐温20、终浓度为0.5%叠氮化钠的组成,溶剂为0.01 M磷酸盐缓冲液;所述终浓度为各物质在洗涤液中的浓度;所述洗涤液的pH值为7.4。

[0030] 上述任一所述试剂盒中,所述样品稀释液为20 $\times$ (0.03 mol/L–0.05 mol/L)的磷酸盐缓冲液。

[0031] 所述酶标记中的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶,其中优选辣根过氧化物酶;酶标记的羊抗鼠二抗或羊抗兔二抗是采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶与二抗进行偶联得到的,辣根过氧化物酶可采用现有技术中的多种方法将其与二抗进行偶联,如戊二醛法,过碘酸钠法等,本发明经过长期的劳动创造将过碘酸钠法进行了改良,使其省时、降低辣根过氧化物酶(HRP)与二抗的浓度比率,节省了原材料。

[0032] 本发明的还提供了—个氟虫腈试剂盒的检测方法:

当包被原为氟虫腈偶联抗原时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入抗体,温育后洗涤拍干,再加入酶标二抗,温育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值;

当包被原为氟虫腈偶联抗原时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入酶标记抗体,温育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值;

当包被原为氟虫腈特异性抗体时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入酶标记氟虫腈半抗原,温育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值;

当包被原为二抗时,向酶标板微孔中加入氟虫腈抗体,温育后洗涤拍干,再加入标准品溶液或样品溶液后加入酶标氟虫腈半抗原,温育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值。

[0033] 本发明提供的检测结果分析过程为:

用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准溶液(0标准)的吸光度值(B0)再乘以100%,即百分吸光度值。计算公式为:百分吸光度值(%) = (B/B0)

$\times 100\%$

以氟虫腓标准品溶液的浓度($\mu\text{g/L}$)的半对数值为X轴,百分吸光度值为Y轴,绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值,相对应每一个样品的浓度则可从标准曲线上读出样本中氟虫腓的含量。

[0034] 本发明中检测结果的分析也可以采用回归方程法,计算出样品溶液浓度。

[0035] 本发明中检测结果的分析还可以利用计算机专业软件,此法更便于大量样品的快速分析,整个检测过程只需较短时间,1.5 h内即可以完成。

[0036] 本发明所提供的氟虫腓检测试剂盒,操作简单、快速,灵敏度高、特异性强、准确性强,对于畜禽产品中氟虫腓残留快速检测具有重大价值。

附图说明

[0037] 图1氟虫腓标准曲线图。

具体实施方式

[0038] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

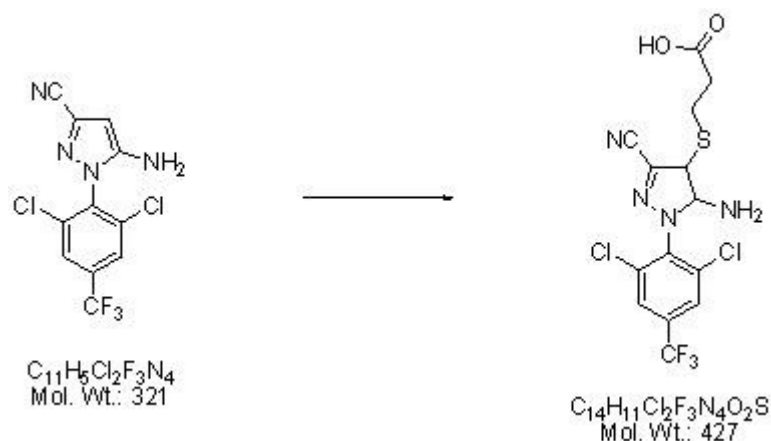
[0039] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0040] 实施例1、氟虫腓检测试剂盒组分的制备

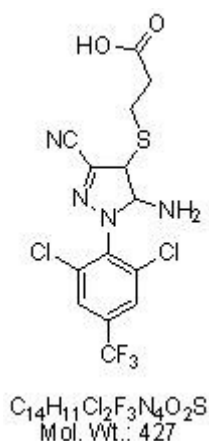
一、氟虫腓半抗原的制备

将50ml圆底烧瓶冲洗干净,用乙醇吹干,将其固定在搅拌器上,加入搅拌子。称取原料1g,用10ml甲醇溶解,呈黄色,搅拌,加入365mg 3-巯基丙酸,搅拌,点板检测反应,纯化,柱层析纯化,收集产物点所在溶液,旋干,即得氟虫腓半抗原。

[0041] 反应方程式如下:



对所得氟虫腓半抗原进行质谱检测,结果显示其化学结构式如式I所示(MW=427),即为氟虫腓半抗原。



[0042] 式I

二、氟虫腈人工抗原的制备

1、氟虫腈免疫原(氟虫腈-BSA)的合成

(1) 将15.93mg氟虫腈半抗原用1.5mL DMF溶解,200rpm搅拌10min,加入EDC 21.5mg溶解后再加入NHS 13mg,室温搅拌(500rpm)活化2-3h。

[0043] (2) 称取BSA 50mg溶于3.5mL 0.1M碳酸氢钠溶液中,200rpm搅拌10min,使其充分溶解,冰浴降温0-4℃,1000rpm搅拌下,将步骤1反应液逐滴加入(1mL/min),500rpm搅拌反应24h。

(3) 将反应产物装入蒸馏水冲洗干净透析袋(10cm),1L0.01M PBS(1×,pH7.2)4℃搅拌(100rpm)透析3d,每天换液3次(早中晚各一次),共计换液9次,将透析产物5000rpm离心6min,1.5mL/管分装,将抗原编号,-20℃保存备用。

[0044] 2、氟虫腈包被原(氟虫腈-OVA)的合成

(1) 将15.93mg氟虫腈半抗原用1.5mL DMF溶解,200rpm搅拌10min,加入EDC 21.5mg溶解后再加入NHS 13mg,室温搅拌(500rpm)活化2-3h。

[0045] (2) 称取OVA 33.6mg溶于3.5mL 0.1M碳酸氢钠溶液中,200rpm搅拌10min,使其充分溶解,冰浴降温0-4℃,1000rpm搅拌下,将步骤1反应液逐滴加入(1mL/min),500rpm搅拌反应24h。

[0046] (3) 将反应产物装入蒸馏水冲洗干净透析袋(10cm),1L0.01M PBS(1×,pH7.2)4℃搅拌(100rpm)透析3d,每天换液3次(早中晚各一次),共计换液9次,将透析产物5000rpm离心6min,1.5mL/管分装,将抗原编号,-20℃保存备用。

[0047] 用MALDI-TOF-MS鉴定氟虫腈人工抗原。

[0048] 三、氟虫腈单克隆抗体的制备

1、动物免疫

用制备出的免疫原(氟虫腈-BSA)按100μg/只,以生理盐水溶解免疫原与弗氏完全佐剂等体积混匀,颈背部皮下注射免疫6~8周龄Balb/c雌鼠,初次免疫后第7、14、28天以免疫原与弗氏不完全佐剂等体积混匀,各追加免疫一次,融合前3天以免疫复合物100μg/只,不加弗氏佐剂再追加免疫一次。

[0049] 2、细胞融合与克隆

按常规方法进行,取免疫小鼠的脾细胞与处于对数生长期的鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)

混合,然后在45s内缓慢加入预热的融合剂(PEG4000)进行融合,用HAT培养基悬浮均匀,再加入适量的饲养细胞,培养于96孔培养板,于37℃,5%CO₂培养箱中培养,5天后用HT培养基半换液,9天时候进行全换液。

[0050] 细胞融合后,待细胞长到培养孔面积的1/4时,采用分步筛选法筛选杂交瘤细胞。初选采用间接ELISA方法,以包被抗原(预先用方阵法常规滴定其最佳包被浓度和阳性血清稀释度)包被酶标板,加入被测孔培养上清,孵育,清洗后加入羊抗鼠IgG-HRP和IgM-HRP,OPD进行显色反应。筛选出的阳性孔再用间接竞争ELISA方法筛选,先将细胞上清与100μg/mL的氟虫腈等体积混合,37℃水浴作用30min,再加入到包被好的酶标板中。同时用PBS取代氟虫腈作对照,其余步骤同上。若经氟虫腈阻断后的OD_{450nm}值下降到对照孔的50%以下,则判为阳性,经2~3次检测都为阳性的孔,立即用有限稀释法进行亚克隆化。

[0051] 3、单克隆抗体的制备及纯化

将2~3次亚克隆建株后的杂交瘤细胞扩大培养,收集上清液用间接ELISA测定效价,冻存;并取8~10周龄Balb/c小鼠腹腔注射液体石蜡0.5mL/只,7~10日后腹腔注射杂交瘤细胞1~2×10⁵/只,7~10日后抽取小鼠腹水。收集细胞上清或腹水,采用间接ELISA法测定其效价(测定效价时以P/N>2.1的细胞上清或腹水最大稀释倍数表示),结果表明细胞上清的效价为1:10000,腹水的效价为1:50000。接着,用辛酸-饱和硫酸铵法对其进行纯化,纯化后放入-20℃环境保存。

[0052] 四、氟虫腈抗血清的制备

1、动物免疫

用氟虫腈人工抗原“氟虫腈-BSA”作为免疫原免疫新西兰大白兔。每次免疫剂量为100~200μg,免疫方式为双肩部和后大腿皮下多点注射,每个区域大约用1/4的免疫原。首免时将免疫原用生理盐水稀释,然后与弗氏不完全佐剂进行1:1(体积比)混合制成乳化剂,每间隔2周取相同剂量免疫原加等体积弗氏不完全佐剂混合乳化后加强免疫一次,采用此方式共加免3次后,间隔3~4周再取相同剂量免疫原加弗氏不完全佐剂进行末次免疫,耳动脉取血检测抗体效价。末次免疫7~10天后采用颈动脉放血,每只兔子可得血100~120mL左右,取完的血在4℃冰箱放置3~4小时,离心,分离出血清。

[0053] 2、抗血清效价测定

采用间接ELISA法测定步骤一所得血清的抗体效价,具体如下:

1)包被:在96孔酶标板中加入100μL浓度为2μg/mL的“氟虫腈-OVA”溶液(用包被缓冲液进行稀释),同时设置不包被抗原的对照,4℃包被过夜,用PBS缓冲液洗涤3次。

[0054] 包被缓冲液:pH9.6、0.05M的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(溶剂为水,溶质及其浓度如下:Na₂CO₃1.59g/L和NaHCO₃2.93g/L)。

[0055] 2)封闭:加入150μL/孔的封闭液,在37℃孵育2h,弃封闭液,洗涤3次,拍干。置于4℃冰箱保存备用。

[0056] 封闭液:含有0.5%(体积百分含量)小牛血清、3%(3g/100mL)酪蛋白的磷酸盐缓冲液,pH7.4。

[0057] 3)加待测样品:吸取不同稀释度的待测血清100μL,加入对应的酶标板中,37℃孵育30min,洗板4次,拍干。

[0058] 同时设置未经免疫的兔血清的对照;以PBS代替待检测样品的对照(阴性对照孔)。

[0059] 4) 加酶标二抗:取辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG抗体,按体积比1:5000倍稀释后,100 μ l/孔,37℃孵育20至30min,洗涤4次,拍干。

[0060] 5) 显色:将20 $\times$ TMB稀释至1 $\times$ TMB,按100 μ l/孔加入,37℃显色15-30min。

[0061] 6) 终止:加入终止液(2M H_2SO_4) 50 μ l/孔。

[0062] 7) 读数:以450nm单波长测定各孔OD值,以与阴性对照孔(以PBS代替待测样品的对照)OD值的比值(P/N)大于2.1为限,作为判断为血清效价的临界点。

[0063] ELISA结果判定方法:以P/N>2.1的血清最大稀释倍数表示。

[0064] 结果表明血清中的抗体效价为1:16000。

[0065] 实施例2、氟虫腈试剂盒的制备及应用

一、氟虫腈试剂盒由下述物质组成:

1、氟虫腈标准品工作液:6瓶,1.5mL/瓶,浓度为0ng/mL、0.3ng/mL、0.9ng/mL、2.7ng/mL、8.1ng/mL、24.3ng/mL;

2、氟虫腈酶标板:1块(8孔 $\times$ 12条),为包被了实施例1制备得到的“氟虫腈-OVA”的酶标板。

[0066] 3、氟虫腈抗体工作液:1瓶(10mL),为抗体稀释液将抗体进行1:8000稀释,抗体稀释液为含6%(体积分数)山羊血清的0.2MPBS,所述氟虫腈抗体为实施例3制备得到的抗血清纯化所得的抗体。

[0067] 4、酶标记物工作液:经辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠的抗体。

[0068] 5、样品稀释液:0.01M pH7.4的PBS。

[0069] 6、洗涤液:0.01M pH7.4的PBST溶液。

[0070] 7、底物A液、底物B液各1瓶(7mL)。其中,底物A为2%过氧化脲水溶液。底物B为1%四甲基联苯胺水溶液。

[0071] 8、终止液:1瓶(7mL),为2 M H_2SO_4 溶液。

[0072] 9、盖板膜;

10、自封袋。

[0073] 二、氟虫腈试剂盒的应用

(一)检测方法

1、样品前处理

称取1 $\pm$ 0.05 g 均质后的样品(动物肉和内脏、鸡蛋、牛奶、动物制品)于50mL 离心管中;依次加入1 g 氯化钠、3 mL 乙腈(分析纯),充分涡动5 min;4000 g 以上,离心5 min;取1 mL 上清液于干净离心管中;50-60℃水浴氮气吹干;加入1 mL 样品稀释液,充分涡动1 min。

[0074] 2、用试剂盒检测

(1)将板条插入酶标板架上,并记录下各标准品和样品的位置,建议均做双孔平行,未使用的板条用自封袋密封后,立即保存于2-8℃环境中;

(2)将50 μ L各浓度的氟虫腈标准品工作液(或待测样品溶液)分别加入对应的标准品(或待测样品孔)中;

(3)在每孔中加入50 μ L酶标记物工作液,再在每孔中加入80 μ L抗体工作液;

(4) 盖好盖板膜,轻轻振荡酶标板10s,充分混匀,室温下(25 $\pm$ 2℃),避光反应30min;

- (5) 揭开盖板膜;
- (6) 倒掉板孔中液体,在每孔加入260μL洗涤工作液,充分洗涤4次,每次浸泡15-30s;
- (7) 倒掉板孔中液体,将酶标板倒置于吸水纸上,拍干;
- (8) 立即在每孔中加入100μLA、B混合液;
- (9) 盖好盖板膜,轻轻振荡酶标板10s,充分混匀,室温下(25±2℃),避光反应15-20min;
- (10) 揭开盖板膜,在每孔中加入50μL终止液,轻轻振荡酶标板10s,充分混匀;
- (11) 终止后5min内用酶标仪在双波长450nm、630nm下读取酶标板吸光度值。

[0075] 3、结果计算或判定

(1) 各标准品(或待测样品)的平均吸光度值,除以零标(浓度为0ng/mL的标准品)吸光度值,乘以100,可以得到各标准品对应的吸光度的百分比,即百分吸光度值。

[0076] (2) 以各标准品的百分吸光度值为纵坐标,以对应的氟虫腈浓度为横坐标绘制标准曲线。标准曲线图如图1所示。

[0077] (3) 将待测样品的百分吸光度值代入标准曲线方程,可得出待测样品对应的浓度,再乘以相应样品的稀释倍数,方得待测原样品中氟虫腈的实际含量。

[0078] 三、氟虫腈试剂盒检测氟虫腈

1、准确度和精密度试验

组织、内脏、肉制品、牛奶、鸡蛋的空白样品中添加氟虫腈,使氟虫腈在样品中的终浓度分别为1.0μg/L、2.0μg/L;将添加后的样品分别按照本实施例步骤二中所述方法进行前处理,得到检测样本溶液。

[0079] 从3个不同批次的试剂盒进行检测,每个实验重复5次,分别计算变异系数。结果分别见表1-表5。

[0080] 批内变异系数的计算方法:批内变异系数 = 同一次测定中各平行样本的变异系数。

[0081] 批间变异系数的计算方法:批间变异系数 = 同一样本在不同批次测定结果的变异系数,取其平均值。

[0082] 表1准确度和精密度(组织)

添加浓度 /μg/L	批次	检测结果/μg/L					批内变 异系数 CV (%)	批间变 异系数 CV (%)
		1	2	3	4	5		
1.0	第一批	0.99	1.17	0.98	1.10	1.11	7.7	11.5
	第二批	1.02	1.03	0.83	0.84	1.03	11.1	
	第三批	1.10	0.93	0.91	0.88	0.92	9.2	
2.0	第一批	1.99	1.88	1.91	1.69	1.78	6.3	9.9
	第二批	1.81	1.61	1.76	2.05	1.82	8.7	
	第三批	1.89	1.89	2.06	1.98	1.97	3.6	

表2准确度和精密度(内脏)

添加浓度 /μg/L	批次	检测结果/μg/L					批内变 异系数 CV (%)	批间变 异系数 CV (%)
		1	2	3	4	5		
1.0	第一批	1.16	1.00	0.98	1.06	1.10	6.9	12.7
	第二批	1.00	0.94	1.09	0.93	1.14	9.0	
	第三批	0.85	0.83	1.16	0.90	0.96	11.1	
2.0	第一批	2.05	1.69	1.70	2.05	1.98	9.7	10.6
	第二批	1.82	1.74	2.04	1.94	1.90	6.1	
	第三批	1.87	1.62	1.81	2.00	1.99	8.3	

表3准确度和精密度(肉制品)

添加浓度 /μg/L	批次	检测结果/μg/L					批内变 异系数 CV (%)	批间变 异系数 CV (%)
		1	2	3	4	5		
1.0	第一批	1.12	1.00	0.86	1.14	0.91	12.3	13.9
	第二批	1.20	1.05	1.13	0.82	1.13	13.8	
	第三批	0.85	0.89	0.92	1.11	0.87	11.3	
2.0	第一批	1.74	2.07	1.65	2.08	1.98	10.3	8.1
	第二批	1.87	1.85	2.01	1.71	2.06	7.3	
	第三批	1.97	2.03	2.09	2.03	1.70	7.8	

表4准确度和精密度(牛奶)

添加浓度 /μg/L	批次	检测结果/μg/L					批内变 异系数 CV (%)	批间变 异系数 CV (%)
		1	2	3	4	5		
1.0	第一批	1.00	1.00	1.15	1.06	0.85	12.1	13.2
	第二批	0.81	0.93	1.06	1.20	1.08	6.3	
	第三批	1.00	1.04	0.94	1.08	1.01	10.3	
2.0	第一批	2.01	1.96	1.76	1.61	1.68	6.9	7.0
	第二批	1.92	2.10	1.81	1.86	1.99	6.9	
	第三批	1.92	1.77	1.82	1.73	1.62	6.8	

表5准确度和精密度(鸡蛋)

添加浓度 /μg/L	批次	检测结果/μg/L					批内变 异系数 CV (%)	批间变 异系数 CV (%)
		1	2	3	4	5		
1.0	第一批	0.82	0.86	1.16	1.15	1.00	11.8	14.1
	第二批	0.85	0.86	0.94	1.12	1.18	9.4	
	第三批	1.17	1.11	0.86	0.90	1.14	10.0	
2.0	第一批	1.79	1.97	2.05	1.64	1.79	8.8	10.5
	第二批	1.67	1.90	1.62	1.95	1.81	8.0	
	第三批	1.63	1.69	1.96	2.04	1.68	10.3	

结果表明,所有样品各添加浓度的回收率均在80.5~120%之间。各添加浓度的批内、批间变异系数均低于15%。

[0083] 2、样本回收率试验

向组织、内脏、肉制品、牛奶、鸡蛋的空白样品中分别添加不同浓度的氟虫腈标准品,使

氟虫腈在样品中的浓度各为1 μ g/L;将添加后的样品分别按照实施例步骤二中所述方法进行前处理,得到样本溶液,再进行检测,每个样本做20个平行,计算回收率(回收率=实测值/添加值)。结果见表6。

[0084] 表6空白样品测定结果统计表(μ g/L)

样品	测定值										平均值	标准差	检测限
组织	0.71	0.71	0.81	0.82	0.83	0.75	0.76	0.79	0.71	0.85	0.79	0.06	0.97
	0.84	0.90	0.76	0.89	0.80	0.72	0.84	0.78	0.75	0.75			
内脏	0.83	0.80	0.75	0.84	0.83	0.70	0.78	0.89	0.79	0.83	0.79	0.05	0.94
	0.73	0.81	0.71	0.78	0.86	0.76	0.76	0.76	0.88	0.75			
肉制品	0.73	0.89	0.71	0.82	0.85	0.83	0.90	0.80	0.76	0.89	0.80	0.06	0.98
	0.75	0.70	0.75	0.73	0.84	0.72	0.80	0.84	0.78	0.85			
牛奶	0.83	0.82	0.86	0.77	0.77	0.85	0.86	0.80	0.82	0.72	0.79	0.05	0.94
	0.73	0.79	0.73	0.83	0.75	0.73	0.74	0.76	0.83	0.75			
鸡蛋	0.76	0.73	0.74	0.80	0.89	0.90	0.87	0.87	0.74	0.83	0.80	0.06	0.98
	0.75	0.76	0.81	0.84	0.90	0.77	0.78	0.72	0.87	0.74			

结果表明,组织最低检出限为0.97 μ g/L,内脏最低检出限为0.94 μ g/L,肉制品最低检出限为0.98 μ g/L,牛奶最低检出限为0.94 μ g/L,鸡蛋最低检出限为0.98 μ g/L,为保障本发明试剂盒的稳定性,可认为氟虫腈检测试剂盒在组织、内脏、肉制品、牛奶、鸡蛋中检测限为1.0 μ g/L。

[0085] 4、交叉反应率试验:

氟虫腈酶联免疫试剂盒的特异性是通过与相应的物质进行交叉反应试验来确定的。交叉反应越小,特异性越好。

[0086] 将氟虫腈及其它类似物(氟甲腈、氟虫腈砒、氟虫腈亚砒、氟虫腈硫醚)分别做系列稀释,分别按照如上步骤二2进行操作,以氟虫腈及其它类似物的系列稀释液替代其中的“氟虫腈标准品工作液”,制作标准曲线,并在曲线上找出各自50%抑制浓度(IC₅₀),具体方法如下:得到纵坐标数值等于50%对应的氟虫腈浓度(ng/mL),即IC₅₀值。用下式计算试剂盒对氟虫腈和各类似物的交叉反应率:

交叉反应率(%)=(引起50%抑制的氟虫腈浓度/引起50%抑制的氟虫腈类似物浓度)×100%。

[0087] 结果如表7所示。

[0088] 表7试剂盒的特异性

名称	交叉反应率(%)
氟虫腈	100.0
氟虫腈砒	102.0
氟虫腈亚砒	40.0
氟甲腈	24.0

氟虫腈硫醚	20.0
-------	------

实验表明,本发明试剂盒对氟虫腈的特异性好,且可以检测氟虫腈类物质,即本发明试剂盒可以检测氟虫腈及其类似物。

[0089] 5、试剂盒保存期试验

试剂盒保存条件为2-8℃,经过12个月的测定,试剂盒的最大吸光度值(零标准)、50%抑制浓度、氟虫腈添加实际测定值均在正常范围之内。考虑到运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在37℃保存的条件下放置8天,进行加速老化实验,结果表明该试剂盒的各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒放入-20℃冰箱冷冻8天,测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在2-8℃至少可以保存12个月以上。

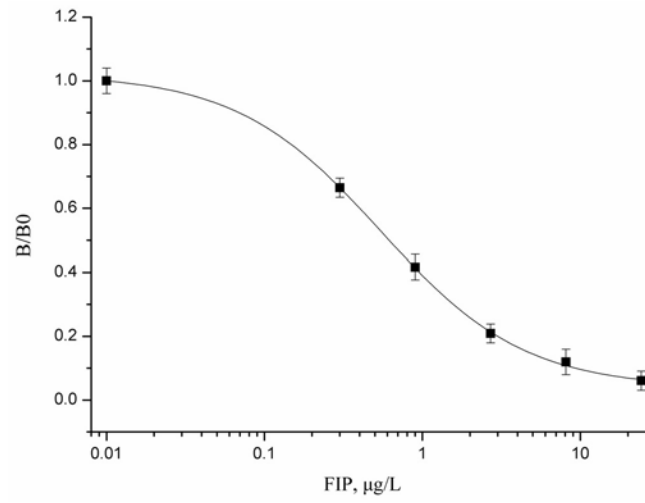


图1

专利名称(译)	一种检测氟虫腈的试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109696548A	公开(公告)日	2019-04-30
申请号	CN2017110990416.6	申请日	2017-10-23
[标]申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
[标]发明人	马立才 聂靖东 刘薇 邢维维 吴雨洋		
发明人	马立才 聂靖东 刘薇 邢维维 吴雨洋		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N2430/10		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测氟虫腈的试剂盒及其制备方法与应用。本发明所提供的氟虫腈检测试剂盒包括氟虫腈酶标板、氟虫腈标准品工作液、氟虫腈抗体工作液、酶标记物工作液、底物液、终止液，还包括式I所示的氟虫腈半抗原与载体蛋白偶联所得的抗原。本发明所提供的氟虫腈检测试剂盒，操作简单、快速，灵敏度高、特异性强、准确性强，对于畜禽产品中氟虫腈残留快速检测具有重大价值。式I。

