



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109061145 B

(45) 授权公告日 2021. 03. 30

(21) 申请号 201811104510.8

(22) 申请日 2018.09.21

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109061145 A

(43) 申请公布日 2018.12.21

(73) 专利权人 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

专利权人 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 鲁亚辉
刘惠民 唐纲岭 颜权平 潘立宁
冯才伟

(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 33/558 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)

审查员 李倩

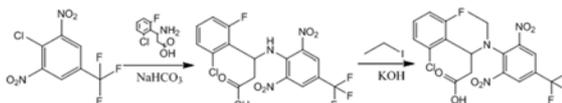
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

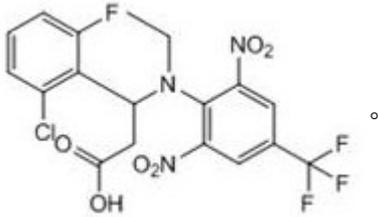
一种检测氟节胺的试纸条及其制备方法和应用

(57) 摘要

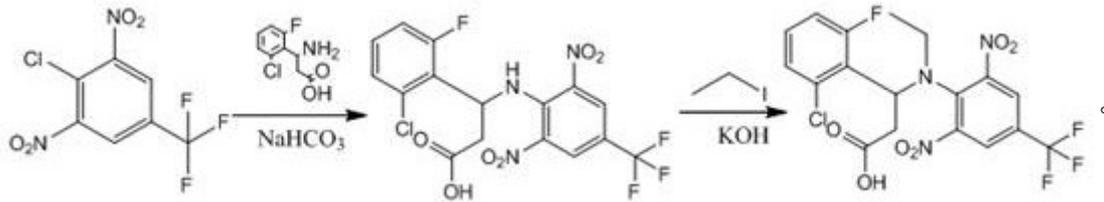
一种检测氟节胺的试纸条及其制备方法和应用,该试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板,反应膜上具有包被有氟节胺半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线,结合物释放垫喷涂有氟节胺单克隆抗体-胶体金标记物,氟节胺半抗原是由2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯与3-氨基-3-(2-氯-6-氟苯基)-丙酸反应生成3-(2-氯-6-氟苯基)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基-苯氨基)-丙酸,再与碘乙烷反应得到的。本发明还提供了氟节胺试纸条的制备方法及应用该试纸条检测烟草中氟节胺残留的方法。其优点在于:操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低,适合大量样本的筛查和现场监控。



1. 一种检测氟节胺的试纸条,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氟节胺半抗原-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氟节胺单克隆抗体-胶体金标记物,所述氟节胺单克隆抗体是以氟节胺半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述氟节胺半抗原-载体蛋白偶联物由氟节胺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、人血清白蛋白,所述氟节胺半抗原是由2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯与3-氨基-3-(2-氯-6-氟苯基)-丙酸反应生成3-(2-氯-6-氟苯基)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基-苯氨基)-丙酸,再与碘乙烷反应得到,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:所述氟节胺半抗原的制备反应过程如下:



3. 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。

4. 根据权利要求1或3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。

5. 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将鼠源抗体免疫羊得到。

6. 一种制备权利要求1-5任一项所述试纸条的方法,其特征在于:该方法包括以下步骤:

- 1) 制备喷涂有氟节胺单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;
- 2) 制备具有包被有氟节胺半抗原-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。

7. 一种应用权利要求1-5任一项所述试纸条检测烟草中氟节胺的方法,其特征在于:该方法包括以下步骤:

- 1) 样本前处理;
- 2) 用所述的试纸条进行检测;
- 3) 分析检测结果。

一种检测氟节胺的试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于胶体金试纸条领域,具体涉及一种检测氟节胺的试纸条及其制备方法和应用,其特别适用于烟草中氟节胺残留的检测。

背景技术

[0002] 氟节胺(flumetralin)是一种接触兼局部内吸型抑制烟草侧芽的二硝基苯胺类植物生长调节剂,它是优良的烟草抑芽剂。1977年由瑞士汽巴-嘉基(Ciba-Geigy)公司开发成功。1990年以抑芽敏(Prime)作为商品名在我国正式登记,登记号为PD116-90。它是一种在国际上较受欢迎的新型高效抑芽剂,适用于烤烟、明火烤烟、马里兰烟、晒烟、雪茄烟。国内浙江省化工研究院最早进行研究开发,并于1998年研制成功,1999年获得了农药临时登记。在烟草人工打顶24小时内施药一次,整个生长季节内不用抹芽。每亩用25%氟节胺乳油60-70 mL,其作用迅速,吸收快,只要施药后2小时无雨,即可奏效,雨季中施药方便。药剂接触完全伸展的叶片不会产生药害,不含有害残留物。使用氟节胺可以节省大量抹芽人工,并使自然成熟度一致,增加产量,提高烟叶上中级的比例和烟叶的内在品质。此外,使用氟节胺还可减轻田间花叶病的接触传染。与其它抑芽剂相比,氟节胺药效很高。国际烟草科学研究合作中心(CORESTA)规定烟草中氟节胺的指导性残留限量为5 mg/kg,我国尚未制定食品中氟节胺的最大残留限量。

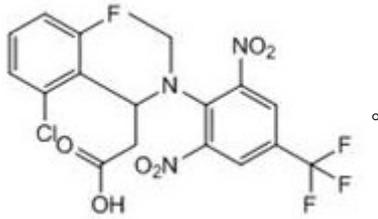
[0003] 目前氟节胺的检测方法主要是仪器检测方法,如气相色谱法、气相色谱-质谱法、气相色谱串联质谱法,等。但是由于这些分析方法需要昂贵的大型仪器设备和专业的检测人员、前处理过程复杂、操作繁琐、检测成本高、分析速度慢,难以满足现场监测和大量样本中农药残留量快速筛查的需要。因此,开发一种不受检测设备限制并且能够实现大批量样品进行快速检测的产品和方法成为迫切需要解决的问题。截至目前,市场上尚未有氟节胺试纸条出现。

发明内容

[0004] 本发明的目的之一是提供一种灵敏度高、操作简单、成本低、检测时间短的氟节胺残留检测试纸条。

[0005] 本发明的检测氟节胺的试纸条,包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板;所述反应膜上具有包被有氟节胺半抗原-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氟节胺单克隆抗体-胶体金标记物,所述氟节胺单克隆抗体是以氟节胺半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述氟节胺半抗原-载体蛋白偶联物由氟节胺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、人血清白蛋白,所述氟节胺半抗原是由2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯与3-氨基-3-(2-氯-6-氟苯基)-丙酸反应生成3-(2-氯-6-氟苯基)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基-苯氨基)-丙酸,再与碘乙烷反应得到,其分子结构式为:

[0006]



[0007] 所述氟节胺半抗原的制备方法如下：

[0008] 1) 取2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯1.00 g, 加20 mL无水乙醇溶解, 得到A液; 另取3-氨基-3-(2-氯-6-氟苯基)-丙酸0.88 g, 加10 mL无水乙醇溶解, 加1 mL含有0.37 g碳酸氢钠的水溶液, 得到B液, 将A液滴加到B液中, 室温反应3 h; TLC检测, 原料基本反应完全; 停止反应, 旋蒸, 除去乙醇, 加80 mL水溶解, 用1 mol/L盐酸调节pH值到6, 加80 mL乙酸乙酯振荡分层, 有机相水洗, 旋蒸, 上硅胶柱, 用体积比为10:1的正己烷与乙酸乙酯洗脱分离, 得到中间体3-(2-氯-6-氟苯基)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基-苯氨基)-丙酸1.53 g;

[0009] 2) 取中间体3-(2-氯-6-氟苯基)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基-苯氨基)-丙酸1.50 g加50 mL乙腈溶解, 加氢氧化钾0.20 g, 加碘乙烷0.57 g, 50°C反应4 h, 检测, 原料反应完全, 停止反应, 旋蒸除去乙腈, 加100 mL水, 溶解, 用1 mol/L盐酸调节pH值到6, 加80 mL乙酸乙酯萃取, 有机相水洗干燥, 蒸干, 得到黄色油状物, 用体积比为1:1的正己烷与二氯甲烷溶液重结晶, 得到氟节胺半抗原产物1.51 g。

[0010] 所述氟节胺单克隆抗体是以氟节胺半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得, 是由氟节胺单克隆抗体杂交瘤细胞株分泌获得; 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) 制备喷涂有氟节胺单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0015] 2) 制备具有包被有氟节胺半抗原-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] 更具体地说, 制备试纸条的过程为:

[0018] 1) 半抗原制备: 将2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯与3-氨基-3-(2-氯-6-氟苯基)-丙酸经过一系列反应得到氟节胺半抗原产物;

[0019] 2) 将氟节胺半抗原与载体蛋白偶联, 得到氟节胺半抗原-载体蛋白偶联物;

[0020] 3) 用氟节胺半抗原-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, 得到氟节胺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) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

[0023] 6) 将步骤3) 制备的氟节胺单克隆抗体加入步骤5) 制备的胶体金中, 得到氟节胺单克隆抗体-胶体金标记物;

[0024] 7) 将氟节胺单克隆抗体-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;

[0025] 8) 将氟节胺半抗原-载体蛋白偶联物包被在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;

[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、0.1 mol/L磷酸盐缓冲液浸泡2 h, 37℃下烘干2 h;

[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, 样品吸收垫盖住结合物释放垫, 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。

[0028] 本发明的又一个目的是提供一种应用上述试纸条检测烟草中氟节胺残留的方法, 它包括步骤:

[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] 本发明的氟节胺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, 将氟节胺单克隆抗体-胶体金标记物固定于结合物释放垫上, 样品中的氟节胺在流动过程中, 与结合物释放垫上的氟节胺单克隆抗体-胶体金标记物结合, 形成氟节胺-抗体-胶体金标记物。样本中的氟节胺与反应膜检测线上的氟节胺半抗原-载体蛋白偶联物竞争结合氟节胺单克隆抗体-胶体金标记物, 根据检测线红色条带有无或颜色深浅来判断待测样品液中是否含有氟节胺残留。

[0033] 检测结果的判断如图2所示。

[0034] 阴性: 检测线(T) 显色比质控线(C) 显色深或显色一致, 表示样本中氟节胺浓度低于检测限, 判为阴性。

[0035] 阳性: 检测线(T) 显色比质控线(C) 显色浅或检测线(T) 不显色, 表示样本中氟节胺浓度等于或高于检测限, 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] 目前尚无用于检测烟草中氟节胺的试纸条, 本发明填补了该空白。本发明的半抗原具有适当末端活性基团, 修饰位点及间隔臂长度选择合适, 且能最大程度模拟氟节胺的分子结构, 以此半抗原为基础开发的试纸条具有灵敏度高、特异性强的特点。同时本发明的试纸条具有成本低、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。综上, 用本发明试纸条检测氟节胺残留的方法简便、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。

[0039] 图2为试纸条检测结果判定图。

[0040] 图3为氟节胺半抗原合成图(该图作为摘要附图)。

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 氟节胺检测试纸条的制备

[0043] 该试纸条的制备方法主要包括以下步骤:

[0044] 1)制备喷涂有氟节胺单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0045] 2)制备具有包被有氟节胺半抗原-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、氟节胺半抗原的制备

[0049] 取2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯1.00 g,加20 mL无水乙醇溶解,得到A液;另取3-氨基-3-(2-氯-6-氟苯基)-丙酸0.88 g,加10 mL无水乙醇溶解,加1 mL含有0.37 g碳酸氢钠的水溶液,得到B液,将A液滴加到B液中,室温反应3 h;TLC检测,原料基本反应完全;停止反应,旋蒸,除去乙醇,加80 mL水溶解,用1 mol/L盐酸调节pH值到6,加80 mL乙酸乙酯振荡分层,有机相水洗,旋蒸,上硅胶柱,用体积比为10:1的正己烷与乙酸乙酯洗脱分离,得到中间体3-(2-氯-6-氟苯基)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基-苯氨基)-丙酸1.53 g,收率92.17%;

[0050] 取中间体3-(2-氯-6-氟苯基)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基-苯氨基)-丙酸1.50 g加50 mL乙腈溶解,加氢氧化钾0.20 g,加碘乙烷0.57 g,50℃反应4 h,检测,原料反应完全,停止反应,旋蒸除去乙腈,加100 mL水,溶解,用1 mol/L盐酸调节pH值到6,加80 mL乙酸乙酯萃取,有机相水洗干燥,蒸干,得到黄色油状物,用体积比为1:1的正己烷与二氯甲烷溶液重结晶,得到氟节胺半抗原产物1.51 g,收率94.97%。

[0051] 核磁鉴定 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 ,300MHZ) δ :11.00 (1H,s),7.141 (1H, dd, J=8.271, J=1.347),7.373 (2H, dd, J=8.373, J=8.271),4.23 (2H, dd, J=8.373, J=1.347),2.880 (2H, d, J=6.843),3.631 (2H, q, J=7.108),1.238 (3H, t, J=7.108),8.75 (2H, d, J=0.000),化学位移 $\delta=11.0$ 的为间隔臂上羧基氢共振吸收峰, $\delta=2.88$ 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。

[0052] 2、免疫原的制备

[0053] 取氟节胺半抗原18 mg,加0.3 mL二甲基甲酰胺(DMF)溶解,澄清,加碳二亚胺(EDC)8.6 mg,搅拌,澄清,加N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)5.2 mg,室温搅拌活化3 h,得到A液;取牛血清白蛋白(BSA)50 mg,加8 mL 0.05 mol/L pH值为7.2的磷酸盐缓冲液(PB)溶解,得到B液,将A液缓慢滴加到B液中,室温搅拌反应5 h。停止反应,0.02 M磷酸盐缓冲液(PBS)透析3天,每天换液三次,得到氟节胺-BSA免疫原,分装,-20℃保存,备用。

[0054] 3、包被原的制备

[0055] 取氟节胺半抗原8 mg,加0.2 mL DMF溶解,澄清,加二环己基碳二亚胺(DCC)4.13 mg,加NHS 2.3 mg,室温搅拌2 h,过滤,除去沉淀物,得到半抗原活化液A液;取卵清蛋白(OVA)50 mg,加8mL 0.05 mol/L pH值为7.2 的PB缓冲液溶解,得到B液,将A液缓慢滴加到B液中,室温搅拌反应5 h。停止反应,0.02 M PBS缓冲液透析3天,每天换液三次,得到氟节胺-OVA包被原,分装,-20℃保存,备用。

[0056] 4、氟节胺单克隆抗体的制备

[0057] 1) 动物免疫

[0058] 将步骤2得到的免疫原注入Balb/c小鼠体内,免疫剂量为150 μg/只,使其产生抗血清。

[0059] 2) 细胞融合和克隆化

[0060] 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,采用间接竞争ELISA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,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0061] 3) 细胞冻存和复苏

[0062] 将杂交瘤细胞用冻存液制成 1×10^6 个/mL的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,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。

[0063] 4) 单克隆抗体的制备与纯化

[0064] 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。

[0065] 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值为7.4。

[0066] 5) 单克隆抗体效价的测定

[0067] 用间接竞争 ELISA法测定抗体的效价为1:(100000~400000)。

[0068] 间接竞争ELISA方法:用氟节胺半抗原-OVA偶联物包被酶标板,加入氟节胺标准品溶液、氟节胺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℃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℃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。

[0069] 6) 单克隆抗体特异性的测定

[0070] 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。

[0071] 本实验将二硝基苯胺类除草剂(氟节胺、仲丁灵、二甲戊灵、氟乐灵)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:

[0072]	交叉反应率 (%) =	引起 50%抑制的氟节胺浓度	×100%
		引起 50%抑制的其他二硝基苯胺类除草剂浓度	

[0073] 结果显示各类似物的交叉反应率为:氟节胺100%、仲丁灵<1%、二甲戊灵<1%、氟乐灵<1%。本发明抗体对仲丁灵、二甲戊灵、氟乐灵等其他二硝基苯胺类除草剂无交叉反

应,只针对氟节胺有特异性结合。

[0074] 5、羊抗鼠抗抗体的制备

[0075] 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。

[0076] 6、氟节胺单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0077] 1) 胶体金的制备

[0078] 用双蒸去离子水将1%氯金酸稀释成0.01%(质量分数),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 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。

[0079] 2) 氟节胺单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0080] 在磁力搅拌下,用0.2 mol/L碳酸钾溶液调胶体金的pH值至7.0,按每毫升胶体金溶液中加入20~50 μg的标准向胶体金溶液中加入氟节胺单克隆抗体,继续搅拌混匀30 min,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10 min。12000 r/min、4℃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℃备用。

[0081] 复溶缓冲液:含酪蛋白0.02%~0.1%(质量分数)、吐温-80 0.05%~0.2%(质量分数)、pH值为7.2的0.02 mol/L磷酸盐缓冲液。

[0082] 7、结合物释放垫的制备

[0083] 将结合物释放垫浸泡于含有牛血清白蛋白(牛血清白蛋白在缓冲液中的浓度为0.5%)、pH值为7.2、0.5 mol/L的磷酸盐缓冲液中,均匀浸湿1 h,37℃烘3 h备用。用Isoflow喷膜仪将制备好的氟节胺单克隆抗体-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氟节胺单克隆抗体-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。

[0084] 8、反应膜的制备

[0085] 将氟节胺半抗原-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。

[0086] 包被过程:用磷酸缓冲液将氟节胺半抗原-卵清蛋白偶联物稀释到10 mg/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0.8 μL/cm;用0.01 mol/L、pH值为7.4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线),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。

[0087] 9、样品吸收垫的制备

[0088] 将样品吸收垫置于含0.5%牛血清白蛋白(体积分数)、pH值为7.2、0.1 mol/L磷酸盐缓冲液中浸泡2 h,37℃烘2 h备用。

[0089] 10、试纸条的组装

[0090] 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。

[0091] 实施例2 样品中氟节胺残留的检测

[0092] 1、样品的前处理

[0093] 称取 1.0 ± 0.05 g粉碎的烟叶样本至50 mL离心管中，加入10 mL 50%甲醇水溶液，用匀浆机将其充分打碎。将打碎的样本转移至注射器中，使用滤膜进行过滤。取100 μ L样本液加入400 μ L去离子水进行稀释。

[0094] 2、用试纸条进行检测

[0095] 用移液器取稀释后的样本液70 μ L(滴管2-3滴)垂直滴于加样孔中；液体流动时开始计时，反应10 min，判读结果。

[0096] 3、分析检测结果

[0097] 阴性(-)：T线显色比C线显色深或显色一致，表示样本中氟节胺浓度低于检测限，如图2(a)。

[0098] 阳性(+)：T线显色比C线显色浅或T线不显色，表示样本中氟节胺浓度等于或高于检测限，如图2(b)。

[0099] 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2(c)。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。

[0100] 实施例3 样品检测实例

[0101] 1、检测限试验

[0102] 取空白烟草样本，分别添加氟节胺至终浓度为2.5、5、10 mg/kg，取试纸条进行检测，每个样本重复测定三次。

[0103] 用试纸条检测烟草样本时，根据试纸条显示判断检测限，表明本试纸条对烟草中氟节胺的检测限为5 mg/kg。

[0104] 2、假阳性率、假阴性率试验

[0105] 分别取已知氟节胺含量大于检测限的烟草阳性样本各20份和含量小于检测限的阴性样本各20份，用三批试纸条进行检测，计算其阴阳性率。结果见下表。

[0106] 表1 假阳性率、假阴性率试验结果

阳性/阴性 样本	阳性样本 (20份)	阴性样本 (20份)
烟草	均为阳性	均为阴性

[0108] 结果表明：分别用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；分别检测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。说明本发明的检测氟节胺的试纸条可以对烟草中氟节胺残留进行快速检测。

[0109] 3、特异性试验

[0110] 用氟节胺试纸条检测500 μ g/L的二甲戊灵、仲丁灵、氟乐灵等二硝基苯胺类除草

剂。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500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的二甲戊灵、仲丁灵、氟乐灵等二硝基苯胺类除草剂无交叉反应,特异性良好。

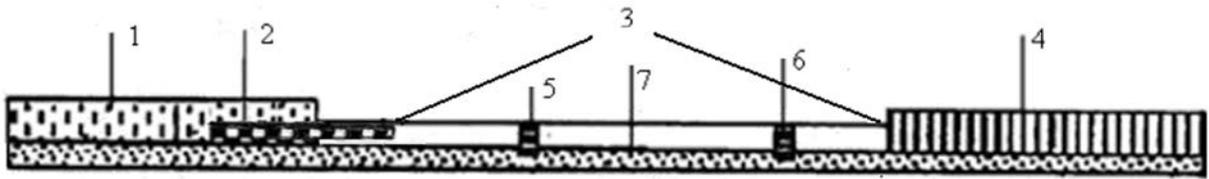


图1

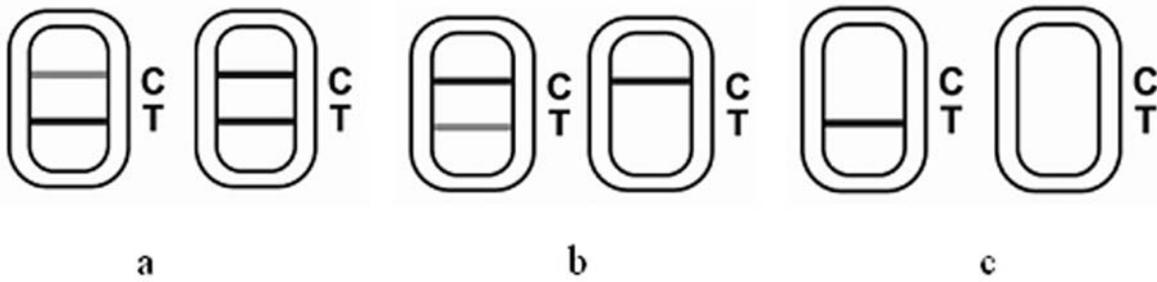


图2

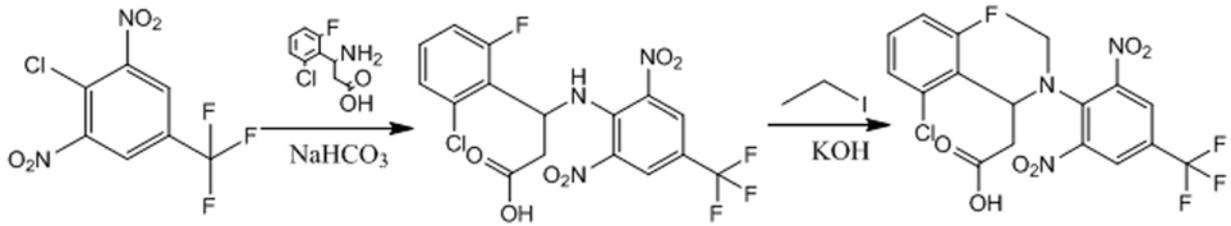


图3