



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109061148 B

(45) 授权公告日 2021.07.16

(21) 申请号 201811104541.3

(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 109061148 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 鲁亚辉 崔娜
刘惠民 唐纲岭 颜权平 潘立宁
申梁

(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)

(56) 对比文件

CN 105785011 A, 2016.07.20

CN 101066928 A, 2007.11.07

Andreas J. Schuetz 等. Selection of hapten structures for indirect immunosensor arrays. 《Fresenius' Journal of Analytical Chemistry》. 2015, 第363卷

审查员 李倩

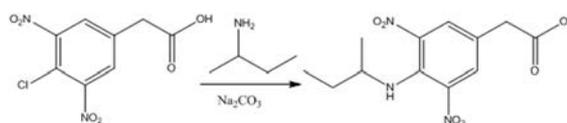
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

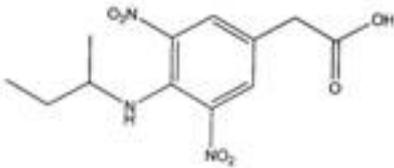
一种检测仲丁灵的试纸条及其制备方法和应用

(57) 摘要

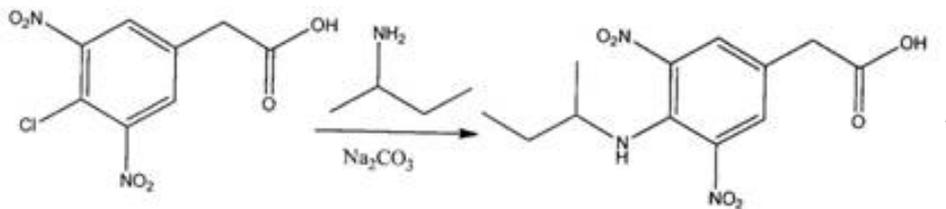
本发明提供一种检测仲丁灵的试纸条及其制备方法和应用, 该试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板; 其特征在于: 所述反应膜上具有包被有仲丁灵半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线, 所述结合物释放垫上喷涂有仲丁灵单克隆抗体-胶体金标记物, 所述仲丁灵半抗原是由4-氯-3,5-二硝基苯乙酸与丁胺反应得到。本发明还提供一种应用上述试纸条检测样品中仲丁灵的方法。本发明提供的试纸条和检测方法具有操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低、不受检测设备限制的优点, 能够实现对大批量的仲丁灵样品进行快速检测和现场监控。



1. 一种检测仲丁灵的试纸条,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仲丁灵半抗原-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,所述结合物释放垫上喷涂有仲丁灵单克隆抗体-胶体金标记物;所述仲丁灵单克隆抗体是以仲丁灵半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述仲丁灵半抗原-载体蛋白偶联物由仲丁灵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,所述仲丁灵半抗原是由4-氯-3,5-二硝基苯乙酸与丁胺反应得到,其分子结构式为:



所述仲丁灵半抗原的制备反应过程如下:



2. 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,且结合物释放垫1/3~1/2被覆盖于样品吸收垫下。

3. 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以鼠源抗体为免疫原对山羊进行免疫制备获得。

4. 一种制备权利要求1-3任一项所述试纸条的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 制备喷涂有仲丁灵单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

2) 制备具有包被有仲丁灵半抗原-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。

5. 一种应用权利要求1-3任一项所述试纸条检测烟叶样品中仲丁灵的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

1) 对样品进行前处理;

2) 用所述的试纸条进行检测;

3) 分析检测结果。

一种检测仲丁灵的试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及仲丁灵的检测,具体是一种检测仲丁灵的试纸条及其制备方法和应用,其特别适用于烟草及烟草制品中仲丁灵残留的检测。

背景技术

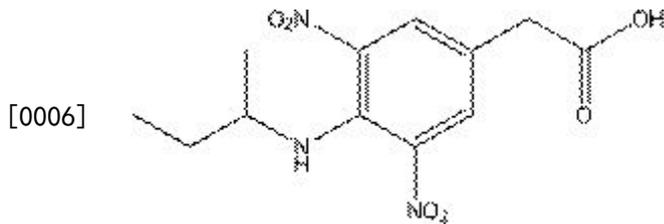
[0002] 仲丁灵(Butralin)又名地乐胺、双丁乐灵、硝苯胺灵、比达宁、止芽素,化学名称为N-仲丁基-4-特丁基-2,6-二硝基苯胺,分子式为 $C_{14}H_{21}N_3O_4$ 。仲丁灵为二硝基苯胺类除草剂,纯品为橙黄色结晶体,易溶于有机溶剂,而难溶于水,有挥发性,受光后易分解,对人畜等动物类毒性较低。该药为选择性萌前除草剂,其作用与氟乐灵相似。药剂进入植物体后,主要抑制分生组织的细胞分裂,从而抑制杂草的幼芽及幼根生长,导致杂草死亡。仲丁灵可应用于大田作物抑制杂草生长,也可用于水产养殖清除水体中的杂藻,仲丁灵在烟草生产中应用较多,主要用来抑制烟草叶芽生长。国际烟草科学研究合作中心(CORESTA)规定烟草中仲丁灵的指导性残留限量为5 mg/kg。

[0003] 目前,有关仲丁灵残留检测的研究多集中在气相色谱法、液相色谱法、气相色谱串联质谱法、液相色谱串联质谱等色谱质谱方法,仪器方法虽具备检测灵敏度高、特异性强等优势,但是样本前处理繁琐、耗时,需要昂贵的大型仪器和设备,配备专业的检测技术人员进行操作和管理,无法进行现场大规模检测,时效性差。因此,开发一种不受检测设备限制并且能够实现对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。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有的检测仲丁灵的方法存在的对设备依赖性高,并且不能够实现对大批量样品的快速检测的特点,提供一种操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低、不受检测设备限制的试纸条及其制备方法和应用,以实现对大批量的仲丁灵样品进行快速检测和现场监控。

[0005] 为了实现本发明的目的,本发明提供了一种检测仲丁灵的试纸条,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仲丁灵半抗原-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,所述结合物释放垫上喷涂有仲丁灵单克隆抗体-胶体金标记物,所述仲丁灵单克隆抗体是以仲丁灵半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述仲丁灵半抗原-载体蛋白偶联物由仲丁灵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,所述仲丁灵半抗原是由4-氯-3,5-二硝基苯乙酸与丁胺反应得到,其分子结构式为:



[0007] 所述仲丁灵半抗原的具体制备方法如下:

[0008] 取4-氯-3,5-二硝基苯乙酸1.00 g,加50 mL乙醇溶解,加碳酸钠0.45 g,搅拌,加丁胺0.31 g,80°C油浴加热,搅拌3 h,检测,原料基本反应完全;停止反应,冷却到室温,旋蒸,除去乙醇,加80 mL水,用1 mol/L盐酸调节pH值到4,有大量浑浊,加80 mL乙酸乙酯萃取,水洗,上硅胶柱,用体积比为5:1的二氯甲烷/甲醇洗脱分离,得到仲丁灵半抗原产物1.05 g。

[0009] 所述羊抗鼠抗抗体是以鼠源抗体为免疫原对山羊进行免疫制备获得。

[0010] 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。

[0011] 所述底板为PVC底板或其他硬质不吸水的材料;所述样品吸收垫为吸滤纸或滤油纸;所述结合物释放垫为玻璃棉或聚酯材料;所述吸水垫为吸水纸;所述反应膜为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜。

[0012] 一种制备上述试纸条的方法,包括以下步骤:

[0013] 1) 制备喷涂有仲丁灵单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0014] 2) 制备具有包被有仲丁灵半抗原-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;

[0015] 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。

[0016] 更具体地说,制备试纸条的过程为:

[0017] 1) 将4-氯-3,5-二硝基苯乙酸与丁胺反应,制备仲丁灵半抗原;

[0018] 2) 将仲丁灵半抗原与载体蛋白偶联,制备仲丁灵半抗原-载体蛋白偶联物;

[0019] 3) 用仲丁灵半抗原-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,得到分泌仲丁灵单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0020] 4) 提取小鼠IgG免疫健康山羊,得到羊抗鼠抗抗体;

[0021] 5) 分别将仲丁灵半抗原-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;

[0022] 6) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

[0023] 7) 将制备的仲丁灵单克隆抗体加入到制备的胶体金中,得到仲丁灵单克隆抗体-胶体金标记物;

[0024] 8) 将仲丁灵单克隆抗体-胶体金标记物喷涂在结合物释放垫上,37°C烘1 h后取出,置于干燥环境中保存备用;

[0025] 9) 将样品吸收垫用含0.5%牛血清白蛋白(质量分数)、pH值为7.2的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液浸泡2 h,37°C下烘干2 h;

[0026] 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。结合物释放垫的1/3被样品吸收垫覆盖可以延长检测结果观察时间,可使样品吸收垫将检测液体充分吸收并与金标抗体充分反应,从而减少误差。

[0027] 应用上述试纸条检测样品中仲丁灵的方法,包括如下步骤:

[0028] 1)对样品进行前处理;

[0029] 2)用试纸条进行检测;

[0030] 3)分析检测结果。

[0031] 本发明的检测仲丁灵的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,将仲丁灵单克隆抗体-胶体金标记物固定于结合物释放垫上,样品中的仲丁灵在流动过程中,与结合物释放垫上的仲丁灵单克隆抗体-胶体金标记物结合,形成仲丁灵-抗体-胶体金标记物。样本中的仲丁灵与反应膜检测线上的仲丁灵半抗原-载体蛋白偶联物竞争结合仲丁灵单克隆抗体-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仲丁灵残留。

[0032] 检测时,样品经处理后滴入样品吸收垫,当仲丁灵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仲丁灵半抗原-载体蛋白偶联物结合,在检测线(T)和质控线(C)处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;如果仲丁灵在样品中的浓度等于或高于检测限,单克隆抗体-胶体金标记物会与仲丁灵全部结合,从而在T线处因为竞争反应不会与仲丁灵半抗原-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。

[0033] 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。

[0034] 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。

[0035] 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。

[0036] 目前尚无用于检测烟草中仲丁灵的试纸条,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,且能最大程度模拟仲丁灵的分子结构,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、不受检测设备限制、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仲丁灵的方法,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

[0037] 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;

[0038] 图2为试纸条检测结果判定图;

[0039] 图3为仲丁灵半抗原合成图(该图作为摘要附图)。

具体实施方式

[0040] 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。另外,本领域的技术人员在所附权利要求书限定的范围内可能会对本发明进行各种改动或修饰,这些改动或修饰同样应落入发明的保护范围。

[0041] 实施例1 检测仲丁灵的试纸条的制备

[0042] 该试纸条的制备方法主要包括以下步骤:

[0043] 1) 制备喷涂有仲丁灵单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0044] 2) 制备具有包被有仲丁灵半抗原-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;

[0045] 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。

[0046] 下面分步详细叙述:

[0047] 1、仲丁灵半抗原的合成(合成路线见附图3)及鉴定

[0048] 取4-氯-3,5-二硝基苯乙酸1.00 g,加50 mL乙醇溶解,加碳酸钠0.45 g,搅拌,加丁胺0.31 g,80°C油浴加热,搅拌3 h,检测,原料基本反应完全;停止反应,冷却到室温,旋蒸,除去乙醇,加80 mL水,用1 mol/L盐酸调节pH值到4,有大量浑浊,加80 mL乙酸乙酯萃取,水洗,上硅胶柱,用体积比为5:1的二氯甲烷/甲醇洗脱分离,得到仲丁灵半抗原产物1.05 g,收率92.11%。

[0049] 核磁鉴定¹H NMR(CDC1₃, 300MHz) δ:11.01(1H, d, J=0.000),8.281(1H, d, J=0.000),4.011(1H, tq, J=6.914, J=6.757),8.281(1H, d, J=0.000),3.822(t, 2H),2.791(1H, ddd, J=7.114, J=6.914),1.591(2H, d, J=6.757),1.251(3H, t, J=7.114),0.901(3H, t, J=7.114)。

[0050] 图谱中,化学位移δ=1.591、1.251、0.901、2.791的为原料丁胺上甲基和亚甲基氢共振吸收峰,δ=4.011的为原料丁胺反应后形成亚胺氢的共振吸收峰,这些峰的存在证明间隔臂偶联成功,仲丁灵半抗原结构正确。

[0051] 2、仲丁灵偶联抗原的合成及鉴定

[0052] 免疫原制备——仲丁灵半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

[0053] 取仲丁灵半抗原11 mg,加二甲基亚砷(DMSO)0.2 mL溶解,加三乙胺20 μL,搅拌,混匀,加氯甲酸异丁酯6 mg,搅拌2 h,得到半抗原活化液A液;取50 mg BSA加0.1 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,继续搅拌5 h,停止反应,0.02 mol/L PBS透析3 d,每天换液3次,得到仲丁灵-BSA偶联物,即为免疫原,分装,-20°C保存,备用。

[0054] 包被原制备——仲丁灵半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0055] 取仲丁灵半抗原6 mg,加N,N-二甲基甲酰胺(DMF)0.2 mL溶解,加碳二亚胺(EDC)4.5 mg,搅拌,澄清,加N-琥珀酰亚胺(NHS)2.24 mg,室温搅拌活化2 h,得到A液;取OVA 50 mg,加6 mL 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 mol/L PBS缓冲液透析3 d,每天换液3次,得到仲丁灵-OVA偶联物,即为包被原,分装,-20°C保存,备用。

[0056] 按合成仲丁灵偶联抗原反应所用半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例,进行紫外

(200 ~ 400 nm)扫描测定,通过比较三者分别在260 nm和280 nm的吸光度值计算其结合比。偶联物仲丁灵半抗原-载体蛋白的最大吸收峰与仲丁灵半抗原、载体蛋白的最大吸收峰相比发生了明显的变化,表明仲丁灵半抗原-载体蛋白的合成是成功的。经计算,半抗原与BSA的结合比为12:1,与OVA的结合比为9:1。

[0057] 3、仲丁灵单克隆抗体的制备

[0058] 1) 杂交瘤细胞的获得

[0059] 首次免疫:将仲丁灵半抗原-BSA偶联物(免疫原)与等量的弗氏完全佐剂充分乳化,皮下注射6周龄的Balb/c小鼠,每只0.2 mL;

[0060] 加强免疫两次:从首次免疫开始,每两周加强免疫一次,用弗式不完全佐剂代替弗氏完全佐剂,方法和剂量同首次免疫;

[0061] 最后一次加强免疫一周后眼底静脉采血测效价和抑制,有抑制且效价达到1:10000以上时进行如下末次免疫:腹腔注射不加任何佐剂的免疫原溶液0.1 mL,三天后处死小鼠,取其脾脏与骨髓瘤细胞融合;

[0062] 采用间接竞争酶联免疫分析方法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,得到并建立稳定分泌仲丁灵单克隆抗体的杂交瘤细胞株,取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。

[0063] 2) 单克隆抗体的制备

[0064] 细胞复苏:取出仲丁灵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;

[0065] 制备腹水与抗体纯化:采用体内诱生法,将Balb/c小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油0.5 mL/只,7天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^5 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化,得到仲丁灵单克隆抗体溶液(-20℃保存)。

[0066] 3) 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:(150000~400000)。

[0068] 间接竞争ELISA方法:用仲丁灵半抗原-OVA偶联物包被酶标板,加入仲丁灵标准品溶液、仲丁灵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] 4) 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] 本实验将仲丁灵及烟草中常见的其他二硝基苯胺类除草剂(氟节胺、异丙乐灵、二甲戊灵、乙丁氟灵、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%抑制的仲丁灵浓度	×100%
		引起 50%抑制的其他二硝基苯胺类除草剂浓度	

[0073] 结果显示仲丁灵及烟草中常见的其他二硝基苯胺类除草剂的交叉反应率为:仲丁灵100%、氟节胺<1%、异丙乐灵<1%、二甲戊灵<1%、乙丁氟灵<1%、氟乐灵<1%。本发明抗

体对氟节胺、异丙乐灵、二甲戊灵、乙丁氟灵、氟乐灵等常见的其他二硝基苯胺类除草剂无交叉反应,只针对仲丁灵有特异性结合。

[0074] 4、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] 5、仲丁灵单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0077] 1) 胶体金的制备

[0078] 用双蒸去离子水将质量分数为1%的氯金酸溶液稀释成0.01%,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1.5 mL质量分数为1%的柠檬酸三钠溶液,继续匀速搅拌加热至溶液呈透亮的酒红色时停止,冷却至室温后用去离子水恢复到原体积,4℃保存。制备好的胶体金用肉眼观察是清亮透明的,没有混浊,液体表面无漂浮物,在日光下观察胶体金的颜色为酒红色。

[0079] 2) 仲丁灵单克隆抗体-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7.2(不同抗体的pH标记范围在7~8之间,可以变化),按每毫升胶体金溶液中加入20~50 μg抗体的标准向胶体金溶液中加入上述仲丁灵单克隆抗体,搅拌混匀,室温静置10 min,加入10% BSA使其在胶体金溶液中的终质量分数为1%,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BSA的质量分数为0.1%~0.3%、吐温-80的质量分数为0.05%~0.2%、pH值为7.2的0.02 mol/L磷酸盐缓冲液。

[0082] 6、结合物释放垫的制备

[0083] 将结合物释放垫浸泡于含0.5% BSA(质量分数)、pH值为7.2的0.5 mol/L磷酸盐缓冲液中,均匀浸湿1 h,37℃烘3 h备用。用Isoflow喷膜仪将制备好的仲丁灵单克隆抗体-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仲丁灵单克隆抗体-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] 7、反应膜的制备

[0085] 将仲丁灵半抗原-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:用磷酸缓冲液将仲丁灵半抗原-卵清蛋白偶联物稀释到1 mg/mL,用Isoflow点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测线(T),包被量为1.0 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),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] 8、样品吸收垫的制备

[0088] 将样品吸收垫用含0.5%牛血清白蛋白(质量分数)、pH值为7.2的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液浸泡2 h,37℃下烘干2h备用。

[0089] 9、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)和质控线(C)均呈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 样品中仲丁灵的检测

[0092] 1、样品的前处理

[0093] 称取 2.0 ± 0.05 g粉碎的样本至50 mL离心管中，加入10 mL 50%的甲醇水溶液，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过滤后的样本液，加入500 μ L去离子水，混匀，待检。

[0094] 2、用试纸条进行检测

[0095] 用移液器取待检样本溶液70 μ L垂直滴于加样孔中，液体流动时开始计时，反应10 min，判定结果。

[0096] 3、分析检测结果

[0097] 阴性(-)：T线显色比C线显色深或与C线显色一致，表示样品中仲丁灵浓度低于检测限，如图2a、2b。

[0098] 阳性(+)：T线显色比C线显色浅或T线不显色，表示样品中仲丁灵浓度等于或高于检测限，如图2c、2d。

[0099] 无效：未出现C线，表明不正确的操作过程或试纸条已失效，如图2e、2f。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] 取空白烤后烟叶样品，在其中添加仲丁灵至终浓度分别为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] 用试纸条检测烤后烟叶样品时，当其中仲丁灵添加浓度为2.5 mg/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；当其中仲丁灵添加浓度为5、10 mg/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，表明本试纸条对烤后烟叶中仲丁灵的检测限为5 mg/kg。

[0104] 2、假阳性率、假阴性率试验

[0105] 取已知仲丁灵含量大于5 mg/kg的烤后烟叶阳性样品20份，已知仲丁灵含量小于5 mg/kg的烤后烟叶阴性样品20份，用三批试纸条进行检测，计算其阴阳性率。

[0106] 结果表明：用3个批次生产的试纸条检测阳性样品时，结果全为阳性，可知阳性样品符合率为100%，假阴性率为0；检测阴性样品时，结果全为阴性，可知阴性样品符合率为100%，假阳性率为0。说明本发明的检测仲丁灵的试纸条可以对烟叶中的仲丁灵进行快速检测。

[0107] 3、特异性试验

[0108] 将氟节胺、异丙乐灵、二甲戊灵、乙丁氟灵、氟乐灵等烟草中常见的其他二硝基苯

胺类除草剂用pH值为7.2、0.2 mol/L的磷酸盐缓冲液稀释至500 mg/L,用仲丁灵试纸条进行检测。结果显示,用该试纸条检测500 mg/L氟节胺、异丙乐灵、二甲戊灵、乙丁氟灵、氟乐灵时,试纸条T线显色比C线显色深或与C线显色一致,呈阴性。说明本试纸条对氟节胺、异丙乐灵、二甲戊灵、乙丁氟灵、氟乐灵等烟草中常见的其他二硝基苯胺类除草剂无交叉反应。

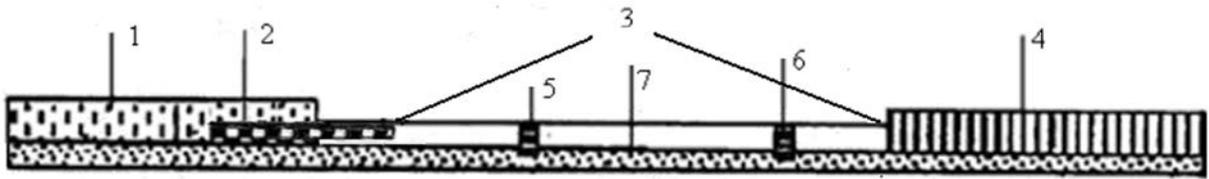


图1

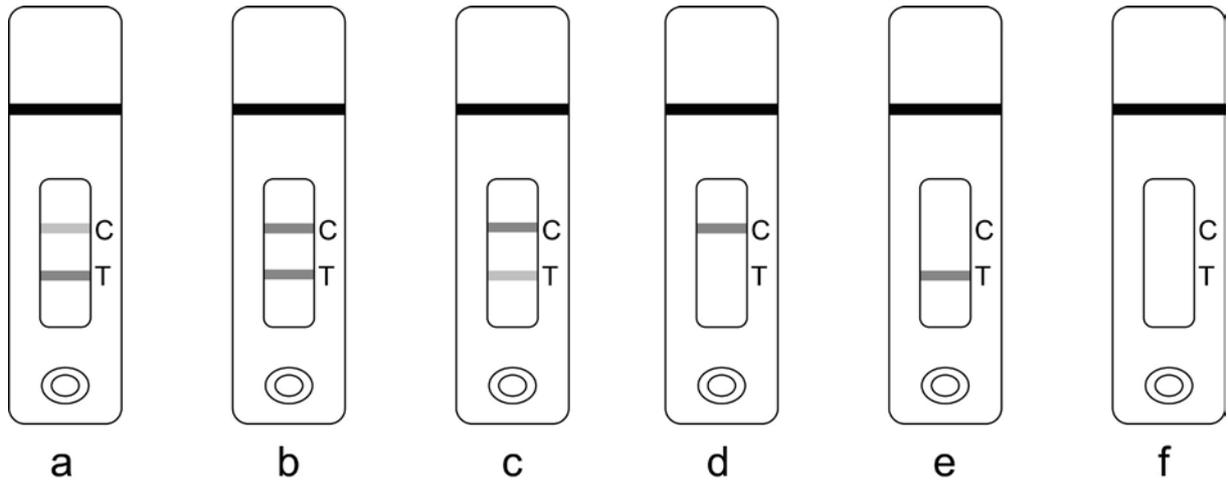


图2

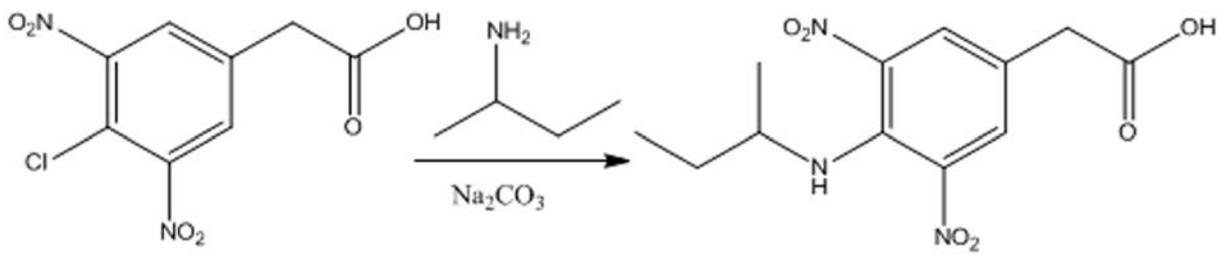


图3