



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109061155 B

(45) 授权公告日 2021.05.11

(21) 申请号 201811104762.0

CN 101093196 A, 2007.12.26

(22) 申请日 2018.09.21

CN 106543049 A, 2017.03.29

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 1232464 A, 1999.10.20

申请公布号 CN 109061155 A

US 2001026920 A1, 2001.10.04

(43) 申请公布日 2018.12.21

WO 2018057647 A1, 2018.03.29

WO 2014086851 A1, 2014.06.12

(73) 专利权人 中国烟草总公司郑州烟草研究院

周洪斌 等. 进出口植物产品中甲霜灵残留量酶联免疫检测试剂盒的研究.《免疫学杂志》.2005,第21卷(第3期),第144-147页.

地址 450001 河南省郑州市高新区枫杨街2号

刘学东 等. 甲霜灵及其旋光体的合成进展.《农药》.2000,第39卷(第12期),第4-7页.

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

NEWSOME,WH.An Enzyme-Linked

(72) 发明人 范子彦 陈黎 何方洋 扶胜

Immunosorbent Assay for Metalaxyl in

刘惠民 唐纲岭 潘立宁 颜权平

Foods.《JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD

(续)

CHEMISTRY》.1985,第33卷(第3期),第528-530

(74) 专利代理机构 郑州中民专利代理有限公司

页.

41110

赵友全 等. 一种新型便携式甲霜灵胶体金

代理人 姜振东

试纸条显色分析仪的研制.《仪器仪表学报》

(51) Int.Cl.

.2009,第30卷(第10期),第2175-2179页. (续)

G01N 33/558 (2006.01)

(续)

审查员 林晓烨

(56) 对比文件

CN 105259351 A, 2016.01.20

CN 104569399 A, 2015.04.29

WO 2018087990 A1, 2018.05.17

CN 1680405 A, 2005.10.12

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

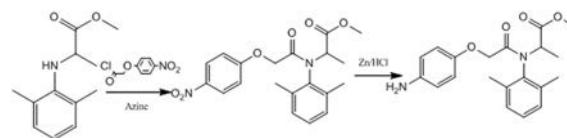
(54) 发明名称

一种检测甲霜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甲霜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甲霜灵半抗原-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甲霜灵单克隆抗体-胶体金标记物。所述甲霜灵半抗原是由N-(2,6-二甲基苯基)丙氨酸甲酯与(4-硝基苯氧基)乙酰氯反应生成硝苯基甲霜灵,再通过锌

粉还原得到。本发明还提供一种应用上述试纸条检测样品中甲霜灵的方法。本发明提供的试纸条和检测方法具有灵敏度高、特异性好、操作简单、检测速度快、成本低、不受检测设备限制的优点,能实现大批量样品中甲霜灵的快速检测和现场监控。



[接上页]

(72) 发明人 曹东山

(51) Int.Cl.

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

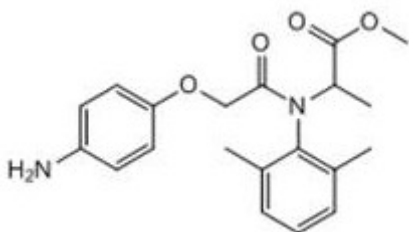
G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

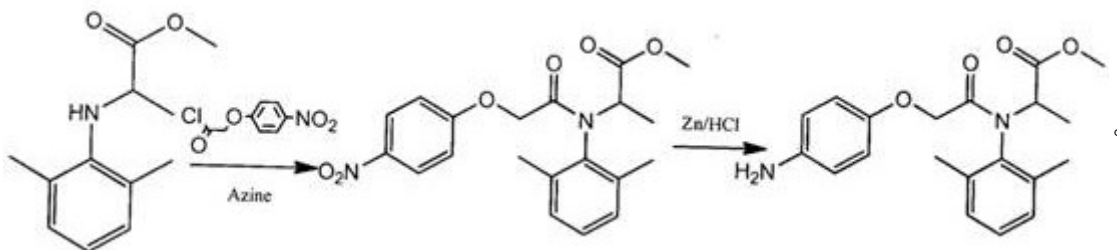
李俊锁 等.磺胺类药物半抗原的合成及结构表征.《中国农业大学学报》.1999,第4卷(第1期),第109-113页.

Sathe,Manisha 等.Design and synthesis of immunoconjugates and development of competition inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (CIEIA) for the detection of O-isopropyl methylphosphonofluoridate (sarin): An organophosphorous toxicant.《JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS》.2011,第192卷(第3期),第1720-1728页.

1. 一种检测甲霜灵的试纸条,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甲霜灵半抗原-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甲霜灵单克隆抗体-胶体金标记物;所述甲霜灵单克隆抗体是以甲霜灵半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述甲霜灵半抗原-载体蛋白偶联物由甲霜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,所述甲霜灵半抗原是由N-2,6-二甲基苯基-丙氨酸甲酯与4-硝基苯氧基-乙酰氯反应生成硝苯基甲霜灵,再通过锌粉还原得到,其分子结构式为:



具体制备反应过程反应式如下:



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) 制备喷涂有甲霜灵单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;
- 2) 制备具有包被有甲霜灵半抗原-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甲霜灵的方法,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。

一种检测甲霜灵的试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及甲霜灵的检测,具体是一种检测甲霜灵的试纸条及其制备方法和应用,其特别适用于烟叶中甲霜灵残留的检测。

背景技术

[0002] 甲霜灵(Metalaxyl)是一种强内吸性取代苯酰胺类杀菌剂,化学名N-(2-甲氧基乙酰基)-N-(二甲基苯基)-消旋-氨基苯酸甲酸,属酰胺类杀菌剂,高效低毒,主要用于卵菌纲、藻菌纲、真菌引起的各种霜霉病、晚疫病、早疫病、猝倒病以及枯腐病、果腐病等。主要抑制病菌菌丝体内蛋白质的合成,使其营养缺乏,不能正常生长而死亡。其内吸和渗透力很强,施药后30min即可在植物体内上下双向传导,对病害植株有保护和治疗作用,对防治瓜果、蔬菜、烟草的霜霉病、疫病有较好疗效。

[0003] 但甲霜灵是环境中重要污染物之一,会对人类造成潜在的健康威胁,并污染环境,所以其在水果、蔬菜、烟草生产中的残留问题受到越来越多的关注。我国针对不同作物,制定了甲霜灵最大残留限量标准,其中黄瓜、辣椒、番茄的最大残留限量为0.5 mg/kg,糙米的最大残留限量为0.1 mg/kg,其他谷物最大残留限量为0.05 mg/kg。国际烟草科学研究中心(CORESTA)规定烟草中甲霜灵的指导性残留限量为2 mg/kg,在实际生产中,以2 mg/kg作为烟草最大残留量判定标准。

[0004] 目前,国内外对甲霜灵残留的检测方法主要有气相色谱-质谱联用法、高效液相色谱-质谱联用法、气相色谱法、高效液相色谱法。仪器方法具备检测灵敏度高、特异性强等优势,但是检测样本前处理繁琐、耗时,样品还需提取和净化处理,同时仪器检测方法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,难以推广。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。

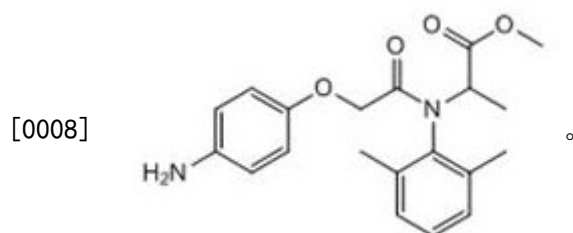
[0005] 发明专利(201510530296.2)公布了检测甲霜灵残留的试纸及其应用,本发明与之最大的区别在于半抗原的结构及制备方法明显不同。众所周知,建立小分子化合物的免疫分析方法的关键是能够制备出对小分子化合物具有高亲和力和高选择性的抗体,而合成端基为功能基团且具有一定长度的连接臂的半抗原是制备抗小分子化合物抗体、建立相应的免疫分析方法的重要过程。半抗原与目标分析物质任何结构上的差异,诸如分子大小、形状、成分、构型、构象、极性、电子云密度等在内的拓扑性征,都可能极大的影响着相应抗体的性质。能否设计合成出性能、效果更好的半抗原,从而得到灵敏度高、特异性好的抗体,正是本发明所关注的重点。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有的检测甲霜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,以实现大批量的甲霜灵样品进

行快速检测和现场监控。

[0007] 为了实现本发明的目的,本发明提供了一种检测甲霜灵的试纸条,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甲霜灵半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗体的质控线,所述结合物释放垫上喷涂有甲霜灵单克隆抗体-胶体金标记物,所述甲霜灵单克隆抗体是以甲霜灵半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述甲霜灵半抗原-载体蛋白偶联物由甲霜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,所述甲霜灵半抗原是由N-(2,6-二甲基苯基)丙氨酸甲酯与(4-硝基苯氧基)乙酰氯反应生成硝苯基甲霜灵,再通过锌粉还原得到,其分子结构式为:



[0009] 所述甲霜灵半抗原的具体制备方法如下:

[0010] 1)取N-(2,6-二甲基苯基)丙氨酸甲酯2.00 g,加吡啶充分溶解,加2.30 g (4-硝基苯氧基)乙酰氯,搅拌,油浴加热,60℃反应2 h,TLC检测,原料基本反应完全,停止反应,恢复至室温,旋蒸,除去吡啶,加60 mL水,用1 mol/L盐酸调节pH值到5,加80 mL乙酸乙酯萃取,有机相无水硫酸钠干燥,上硅胶柱,使用体积比为1:10的乙酸乙酯/正己烷洗脱分离,得到中间产物硝苯基甲霜灵3.68 g;

[0011] 2)取中间产物硝苯基甲霜灵3.60 g,加乙醇溶解,得到A液;取锌粉1.80 g,加10 mL蒸馏水,加稀盐酸0.5 mL,60℃活化20 min,加入A液,继续搅拌3 h,TLC检测,原料全部反应完成,停止反应,抽滤,除去锌粉,滤液蒸干,加50 mL水,用碳酸钠调节pH值到7,加50 mL乙酸乙酯萃取,有机相水洗,无水硫酸钠干燥蒸干,使用体积比为1:2的二氯甲烷/正己烷重结晶,得到甲霜灵半抗原产物3.22 g。

[0012] 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。

[0013] 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。

[0014] 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。

[0015] 一种制备上述试纸条的方法,包括以下步骤:

[0016] 1)制备喷涂有甲霜灵单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0017] 2)制备具有包被有甲霜灵半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗体的质控线的反应膜;

[0018] 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。

[0019] 更具体地说,制备试纸条的过程为:

[0020] 1)将N-(2,6-二甲基苯基)丙氨酸甲酯与(4-硝基苯氧基)乙酰氯反应生成硝苯基甲霜灵,再通过锌粉还原,制备甲霜灵半抗原;

[0021] 2)将甲霜灵半抗原与载体蛋白偶联,制备甲霜灵半抗原-载体蛋白偶联物;

[0022] 3)用甲霜灵半抗原-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,得到分泌甲霜灵单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0023] 4)提取小鼠IgG免疫健康山羊,得到羊抗鼠抗抗体;

[0024] 5)分别将甲霜灵半抗原-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;

[0025] 6)用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

[0026] 7)将制备的甲霜灵单克隆抗体加入到制备的胶体金中,得到甲霜灵单克隆抗体-胶体金标记物;

[0027] 8)将甲霜灵单克隆抗体-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;

[0028] 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℃下烘干2 h;

[0029] 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。

[0030] 应用上述试纸条检测样品中甲霜灵的方法,包括如下步骤:

[0031] 1)对样品进行前处理;

[0032] 2)用试纸条进行检测;

[0033] 3)分析检测结果。

[0034] 本发明的检测甲霜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,将甲霜灵单克隆抗体-胶体金标记物固定于结合物释放垫上,样品中的甲霜灵在流动过程中,与结合物释放垫上的甲霜灵单克隆抗体-胶体金标记物结合,形成甲霜灵-抗体-胶体金标记物。样本中的甲霜灵与反应膜检测线上的甲霜灵半抗原-载体蛋白偶联物竞争结合甲霜灵单克隆抗体-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甲霜灵残留。

[0035] 检测时,样品经处理后滴入样品吸收垫,当甲霜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甲霜灵半抗原-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;如果甲霜灵在样品中的浓度等于或高于检测限,单克隆抗体-胶体金标记物会与甲霜灵全部结合,从而在T线处因为竞争反应不会与甲霜灵半抗原-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。

[0036] 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。

[0037] 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。

[0038] 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。

[0039] 本发明与201510530296.2中半抗原的分子结构及所选择的半抗原分子结构中的修饰位点明显不同，不同的修饰位点所形成的半抗原修饰物的空间结构不同，即与载体结合后生成的人工抗原表面上所暴露出的抗原决定簇不同，导致产生的抗体在效价、亲和力和特异性上都存在差异。

[0040] 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，且能最大程度模拟甲霜灵的分子结构，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甲霜灵的方法，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

[0041] 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；

[0042] 图2为试纸条检测结果判定图；

[0043] 图3为甲霜灵半抗原合成图(该图作为摘要附图)。

具体实施方式

[0044] 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。

[0045] 实施例1 检测甲霜灵的试纸条的制备

[0046] 该试纸条的制备方法主要包括以下步骤：

[0047] 1) 制备喷涂有甲霜灵单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫；

[0048] 2) 制备具有包被有甲霜灵半抗原-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；

[0049] 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。

[0050] 下面分步详细叙述：

[0051] 1、甲霜灵半抗原的合成(合成路线见图3)及鉴定

[0052] 取N-(2,6-二甲基苯基)丙氨酸甲酯2.00 g，加吡啶充分溶解，加2.30 g (4-硝基苯氧基)乙酰氯，搅拌，油浴加热，60℃反应2 h，TLC检测，原料基本反应完全，停止反应，恢复至室温，旋蒸，除去吡啶，加60 mL水，用1 mol/L盐酸调节pH值到5，加80 mL乙酸乙酯萃取，有机相无水硫酸钠干燥，上硅胶柱，使用体积比为1:10的乙酸乙酯/正己烷洗脱分离，得到中间产物硝苯基甲霜灵3.68 g，收率98.92%；

[0053] 取中间产物硝苯基甲霜灵3.60 g，加乙醇溶解，得到A液；取锌粉1.80 g，加10 mL蒸馏水，加稀盐酸0.5 mL，60℃活化20 min，加入A液，继续搅拌3 h，TLC检测，原料全部反应完成，停止反应，抽滤，除去锌粉，滤液蒸干，加50 mL水，用碳酸钠调节pH值到7，加50 mL乙

酸乙酯萃取,有机相水洗,无水硫酸钠干燥蒸干,使用体积比为1:2的二氯甲烷/正己烷重结晶,得到甲霜灵半抗原产物3.22 g,收率96.99%。

[0054] 核磁鉴定¹H NMR(CDC1₃, 300MHz) δ :4.778 (2H, q, J=7.047), 3.646 (3H), 1.104 (3H, d, J=7.047), 4.52 (t, 1H), 7.313 (1H, dd, J=7.888), 2.260 (t, 6H), 7.41 (1H, dd, J=7.888), 6.865 (1H, t, J=7.888), 6.858 (1H, ddd, J=8.804, J=0.545, J=0.000), 6.272 (t, 2H)。图谱中,化学位移 δ =6.272的为间隔臂上苯环氨基氢的共振吸收峰, δ =6.858、6.856的为间隔臂上苯环氢的共振吸收峰,这些峰的存在证明间隔臂偶联成功,甲霜灵半抗原结构正确。

[0055] 2、甲霜灵偶联抗原的合成及鉴定

[0056] 免疫原制备——甲霜灵半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

[0057] 取8 mg甲霜灵半抗原加1 mol/L的稀盐酸0.1 mL,加蒸馏水0.8 mL,0~5℃低温搅拌20 min,加含有1.7 mg亚硝酸钠的水溶液0.1 mL,继续搅拌1 h,得到A液;取50 mg BSA,加0.1 mol/L碳酸钠溶液6 mL溶解,0~5℃搅拌平衡温度20 min,得到B液,将A液滴加到B液中,继续反应2 h。停止反应,0.02 mol/L PBS透析3 d,每天换液三次,分装,得到免疫原,-20℃保存,备用。

[0058] 包被原制备——甲霜灵半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0059] 取6 mg甲霜灵半抗原加1 mol/L的稀盐酸0.7 mL,加蒸馏水0.8 mL,0~5℃低温搅拌20 min,加含有1.3 mg亚硝酸钠的水溶液0.1 mL,继续搅拌1 h,得到A液;取60 mg OVA,加0.1 mol/L碳酸钠溶液6 mL溶解,0~5℃搅拌平衡温度20 min,得到B液,将A液滴加到B液中,继续反应2 h。停止反应,0.02 mol/L PBS透析3 d,每天换液三次,分装,得到包被原,-20℃保存,备用。

[0060] 按合成甲霜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。偶联物甲霜灵半抗原-载体蛋白的最大吸收峰与甲霜灵半抗原、载体蛋白的最大吸收峰相比发生了明显的变化,表明甲霜灵半抗原-载体蛋白的合成是成功的。经计算,半抗原与BSA的结合比为13:1,与OVA的结合比为10:1。

[0061] 3、甲霜灵单克隆抗体的制备

[0062] 1) 杂交瘤细胞的获得

[0063] 首次免疫:将甲霜灵半抗原-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;

[0064] 加强免疫两次:从首次免疫开始,每两周加强免疫一次,用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂,方法和剂量同首次免疫;

[0065] 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;

[0066] 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甲霜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。

[0067] 2) 单克隆抗体的制备

[0068] 细胞复苏:取出甲霜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;

[0069] 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,得到甲霜灵单克隆抗体溶液(-20℃保存)。

[0070] 3) 单克隆抗体效价的测定

[0071] 用间接竞争 ELISA法测定抗体的效价为1:(100000~300000)。

[0072] 间接竞争ELISA方法:用甲霜灵半抗原-OVA偶联物包被酶标板,加入甲霜灵标准品溶液、甲霜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。

[0073] 4) 单克隆抗体特异性的测定

[0074] 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。

[0075] 本实验将甲霜灵及与其结构类似的化合物(毒草胺、甲草胺、乙草胺、异丙甲草胺、丙草胺、丁草胺)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:

[0076]	交叉反应率 (%) =	引起 50%抑制的甲霜灵浓度	×100%
		引起 50%抑制的甲霜灵结构类似物浓度	

[0077] 结果显示甲霜灵及其结构类似物的交叉反应率为:甲霜灵100%、毒草胺<1%、甲草胺<1%、乙草胺<1%、异丙甲草胺<1%、丙草胺<1%、丁草胺<1%。本发明抗体对毒草胺、甲草胺、乙草胺、异丙甲草胺、丙草胺、丁草胺等与甲霜灵结构类似的化合物无交叉反应,只针对甲霜灵有特异性结合。

[0078] 4、羊抗鼠抗抗体的制备

[0079] 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。

[0080] 5、甲霜灵单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0081] 1) 胶体金的制备

[0082] 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。

[0083] 2) 甲霜灵单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0084] 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值标记范围在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甲霜灵单克隆抗体,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。

[0085] 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。

[0086] 6、结合物释放垫的制备

[0087] 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喷膜仪将制备好的甲霜灵单克隆抗体-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甲霜灵单克隆抗体-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。

[0088] 7、反应膜的制备

[0089] 将甲霜灵半抗原-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。

[0090] 包被过程:用磷酸缓冲液将甲霜灵半抗原-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。

[0091] 8、样品吸收垫的制备

[0092] 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2 h备用。

[0093] 9、试纸条的组装

[0094] 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。

[0095] 实施例2 样品中甲霜灵的检测

[0096] 1、样品的前处理

[0097] 1)烤后烟叶样品前处理方法:称取 1.0 ± 0.05 g粉碎的样本至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 μL过滤后的样本液,加入900 μL去离子水,混匀,待检。

[0098] 2)鲜烟叶样品前处理方法:称取 2.0 ± 0.05 g粉碎的样本至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 μL过滤后的样本液,加入300 μL去离子水,混匀,待检。

[0099] 2、用试纸条进行检测

[0100] 用移液器取待检样本溶液70 μL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。

[0101] 3、分析检测结果

[0102] 阴性(-):T线显色比C线显色深或与C线显色一致,表示样品中甲霜灵浓度低于检测限,如图2a、2b。

[0103] 阳性(+):T线显色比C线显色浅或T线不显色,表示样品中甲霜灵浓度等于或高于检测限,如图2c、2d。

[0104] 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。

[0105] 实施例3 样品检测实例

[0106] 1、检测限试验

[0107] 取空白烤后烟叶样品,在其中添加甲霜灵至终浓度分别为1、2、4 mg/kg;取空白鲜烟叶样品,在其中添加甲霜灵至终浓度分别为0.25、0.5、1.0 mg/kg,取试纸条进行检测,每个样本重复测定三次。

[0108] 用试纸条检测烤后烟叶样品时,当其中甲霜灵添加浓度为1 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;当其中甲霜灵添加浓度为2、4 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甲霜灵的检测限为2 mg/kg;用试纸条检测鲜烟叶样品时,当其中甲霜灵添加浓度为0.25 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;当其中甲霜灵添加浓度为0.5、1.0 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,表明本试纸条对鲜烟叶中甲霜灵的检测限为0.5 mg/kg。

[0109] 2、假阳性率、假阴性率试验

[0110] 取已知甲霜灵含量大于2 mg/kg的烤后烟叶阳性样品和甲霜灵含量大于0.5 mg/kg的鲜烟叶阳性样品各20份,已知甲霜灵含量小于2 mg/kg的烤后烟叶阴性样品和甲霜灵含量小于0.5 mg/kg的鲜烟叶阴性样品各20份,用三批试纸条进行检测,计算其阴阳性率。

[0111] 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。说明本发明的检测甲霜灵的试纸条可以对烟叶中的甲霜灵进行快速检测。

[0112] 3、特异性试验

[0113] 将毒草胺、甲草胺、乙草胺、异丙甲草胺、丙草胺、丁草胺等甲霜灵结构类似物用pH值为7.2、0.2 mol/L的磷酸盐缓冲液稀释至50 mg/L,用甲霜灵试纸条进行检测。结果显示,用该试纸条检测50 mg/L毒草胺、甲草胺、乙草胺、异丙甲草胺、丙草胺、丁草胺时,试纸条T线显色比C线显色深或与C线显色一致,呈阴性。说明本试纸条对毒草胺、甲草胺、乙草胺、异丙甲草胺、丙草胺、丁草胺等甲霜灵结构类似物无交叉反应。

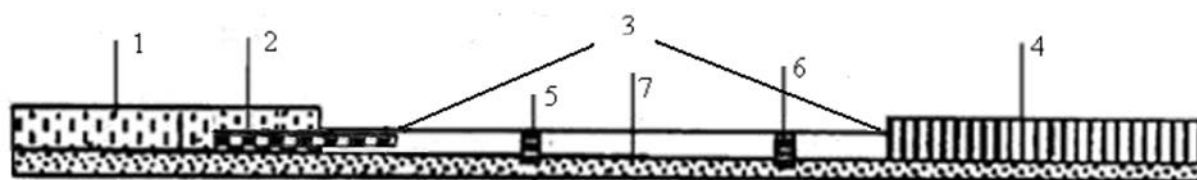


图1

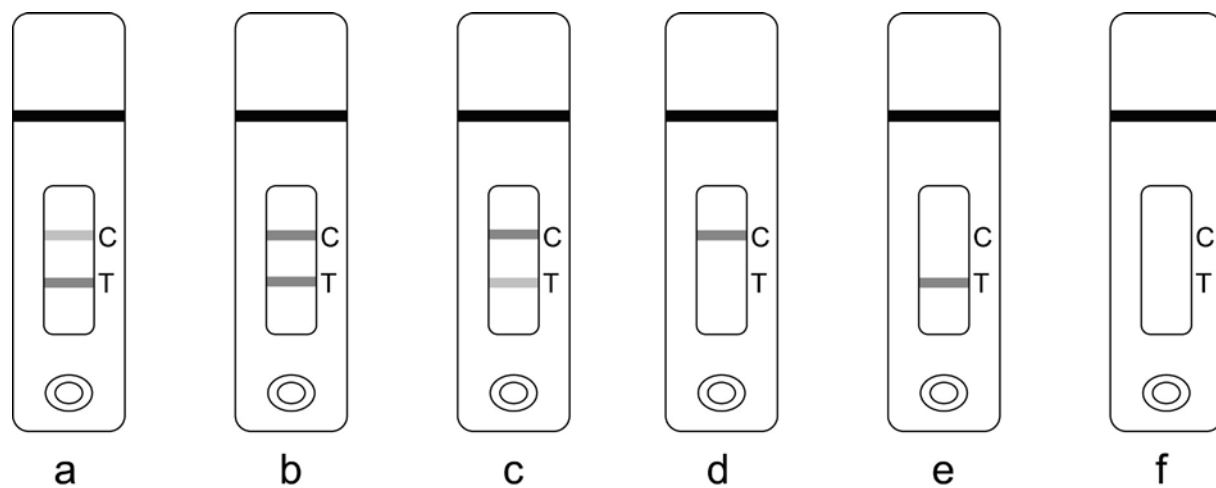


图2

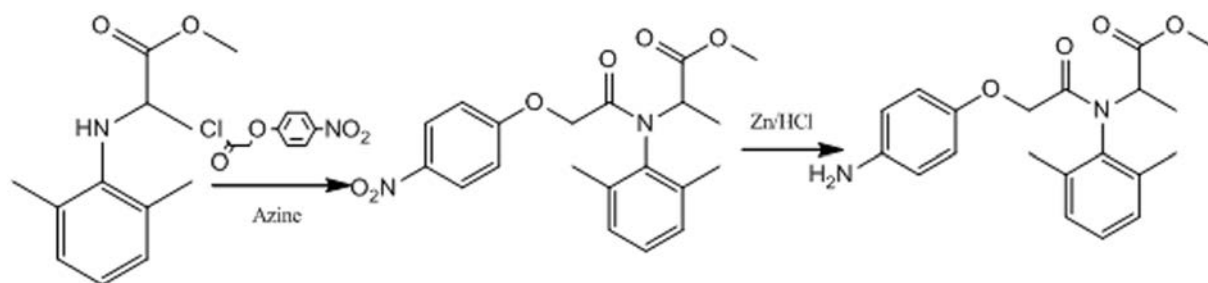


图3