



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106596954 A

(43) 申请公布日 2017. 04. 26

(21) 申请号 201510664825. 8

(22) 申请日 2015. 10. 15

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丁卯新区国家科技园 B11 栋 3 楼

(72) 发明人 洪霞 杜霞 刘静

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

检测苯霜灵的时间分辨荧光免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测苯霜灵的时间荧光分辨荧光免疫分析试剂盒。所述检测苯霜灵的时间分辨荧光免疫分析检测试剂盒是由多孔包被板、缓冲液、苯霜灵标准品、苯霜灵的抗体冻干品、钨标记的羊抗鼠抗体、洗涤液和增强液所组成。所述检测苯霜灵的时间荧光免疫分析试剂盒的检测方法包括下列步骤：(1) 免疫原的制备；(2) 包被原的制备；(3) 单克隆抗体的制备；(4) 样品的前处理及检测。本发明检测时间短、平均回收率高、样品前处理简单、能现场操作检测，应用广泛，检测成本低，同时具有检测特异性强，批内和批间差异小、灵敏度高和操作简单快速，且特别适合于大批量样品的检测等优点。

1. 一种检测苯霜灵的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,其特征在于:由多孔包被板,缓冲液,苯霜灵标准品,苯霜灵的抗体冻干品,钕标记的羊抗鼠抗体,洗涤液和增强液所组成。

2. 一种根据权利要求1所述检测苯霜灵的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,包括免疫原、包被原和单克隆抗体的制备以及样品前处理,其特征在于:

(1) 将苯霜灵与牛血清白蛋白偶联,得到免疫原;

(2) 将苯霜灵与卵血清蛋白偶联,得到包被原;

(3) 用步骤(1)的免疫原免疫小鼠,通过杂交瘤技术,得到分泌抗苯霜灵的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

(4) 以体内诱生腹水法大量制备抗体,使用Protein G柱进行纯化,获得抗苯霜灵的单克隆抗体

(5) 用步骤(2)的包被原包被固相载体;

(6) 将动物组织先经过酸解提取后,再过MAX柱净化,最后加入衍生试剂和催化剂进行处理,得到待测产物;

(7) 将步骤(6)的待检物进行测量荧光强度cps,对照标准曲线计算样品中的苯霜灵苯霜灵含量。

3. 根据权利要求1所述检测苯霜灵的时间荧光免疫分析法试剂盒,其特征在于:所述的固相载体是多孔包被板,采用96孔的多微孔包被板作为固相载体。

4. 根据权利要求1所述检测苯霜灵的时间荧光分辨免疫分析法试剂盒,其特征在于:所述的衍生试剂是丁胺。

5. 根据权利要求1所述检测苯霜灵的时间分辨荧光免疫分析法试剂盒,其特征在于:所述的催化剂是膦基磷酸二乙酯。

6. 根据权利要求1所述检测苯霜灵的时间荧光免疫分析法试剂盒,其特征在于:所述步骤(6)和(7)具体为取包被有苯霜灵-OVA的微孔包被板,加入50 μL处理好的样品到各自的微孔中,加入50 μL以缓冲液稀释的苯霜灵抗体,25~37°C振荡0.5~1小时,洗涤液洗三次,加以缓冲液稀释的100 μL Eu³⁺-羊抗鼠抗体,25~37°C振荡0.5~1小时,洗涤液洗六次,加200 μL增强液振荡5分钟后测量荧光强度cps,从标准曲线计算样品中的苯霜灵含量。

检测苯霜灵的时间分辨荧光免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,具体的说,涉及一种检测苯霜灵的时间分辨荧光免疫分析试剂盒。

背景技术

[0002] 苯霜灵是防治卵菌纲病害的内吸性杀菌剂。用于防治葡萄、烟草、瓜类、大豆和洋葱等作物的霜霉病,马铃薯、番茄、草莓、观赏植物上的疫病。苯霜灵可以单用,也可与保护剂代森锰锌、灭菌丹等混用。由于苯霜灵为易引起病原菌产生耐药性的品种,宜采取混用、轮用或复配成混合杀菌剂。

[0003] 苯霜灵残留分析一般使用气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)及气相色谱质谱联用技术(GC/MS),这些方法灵敏、准确,可以同时测定多种药物,但需要昂贵的仪器,样品前处理复杂、繁琐费时、检测成本较高,而且需专业人员操作,很难满足对样品进行现场、批量、快速检测的需要。因此,开发一种简单快速、适用于农药残留现场监控的分析方法具有重要的现实意义。

[0004] 而时间分辨荧光免疫分析法(TR-FIA)由于其特异性强、灵敏度高、操作简单、廉价,且特别适于大批量样品的检测等优点而越来越被人们所重视和采用。目前还没有针对苯霜灵检测的时间荧光免疫分析法的专利和文献报道。

发明内容

[0005] 为解决以上技术问题,本发明的目的在于提供一种蔬菜水果中苯霜灵残留的检测时间分辨荧光免疫分析试剂盒。

[0006] 本发明的目的之二在于提供一种快速简便地检测蔬菜水果中苯霜灵的时间分辨荧光免疫分析试剂盒的检测方法,用于定量或定性地检测农作物中苯霜灵残留量。

[0007] 本发明目的之一是这样实现的:检测苯霜灵的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,其关键在于由多孔包被板、缓冲液、苯霜灵标准品溶液、抗苯霜灵的抗体冻干品、钕标记的兔抗鼠抗体、洗涤液和增强液体所组成。

[0008] 本发明目的之二是这样实现的:检测苯霜灵的时间分辨荧光免疫分析试剂盒的检测方法,包括免疫原、包被原和单克隆抗体的制备以及样品前处理及检测,其关键在于:

(1) 免疫原的制备:将半抗原苯霜灵与牛血清白蛋白(BSA)偶联,得到免疫原(苯霜灵-BSA);

(2) 包被原的制备:将半抗原苯霜灵与卵血清白蛋白(OVA)偶联,得到包被原(苯霜灵-OVA);

(3) 单克隆抗体的制备:

a. 用步骤(1)的免疫原(苯霜灵-BSA)免疫小鼠,通过杂交瘤技术,得到分泌抗苯霜灵的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

b. 以体内诱生腹水法大量制备抗体,使用 Protein G 柱进行纯化,获得抗苯霜灵的单

克隆抗体 IgG；

c. 用步骤 (2) 的包被原包被 96 孔包被板；

(4) 样品的前处理及检测：

取包被有包被原(苯霜灵-OVA)的多孔包被板,加入 50 μL 的苯霜灵到各自的微孔中,加 50 μL 以缓冲液稀释的抗苯霜灵抗体,25 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 0.5~1 小时,洗涤液洗 3 次,加以缓冲液稀释的 100 μL Eu^{3+} -兔抗鼠抗体,25 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 0.5~1 小时,洗涤液洗 6 次,加 200 μL 增强液振荡 5 分钟后测量荧光强度 cps,根据标准曲线计算样品中的苯霜灵含量。

[0009] 上述的固相载体是多孔包被板,采用 96 孔的多孔包被板作为固相载体。

[0010] 本发明主要采用时间分辨荧光免疫分析方法来检测苯霜灵。采用时间分辨荧光免疫分析的技术主要有两个方面:第一,特异性单克隆抗体制备,用偶联的免疫原免疫小鼠,通过杂交瘤技术,得到分泌抗苯霜灵的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;以体内诱生腹水法大量制备抗体,使用 Protein G 柱进行纯化,获得抗苯霜灵的单克隆抗体 IgG。第二, Eu^{3+} 标记抗体的制备。

[0011] 本发明测定方法:测定的基础是标记免疫反应。包被有苯霜灵-OVA 的多孔包被板,加入测试样品到各自的微孔中,再加入抗苯霜灵抗体,振荡反应,游离的苯霜灵与微孔板上的苯霜灵-OVA 竞争抗苯霜灵抗体,洗涤液洗涤,没有连接的苯霜灵抗体在洗涤步骤中被除去。加入 Eu^{3+} -兔抗鼠抗体,进行标记免疫反应,再用洗涤液洗涤,反应后没有连接的 Eu^{3+} -兔抗鼠抗体在洗涤步骤中被除去。加增强液振荡后,在紫外灯的激发下发射很强的荧光,用时间分辨荧光仪测定其荧光强度 cps,荧光强度与样品中的浓度成反比,对照标准曲线即可确定样品中苯霜灵的量。

[0012] 本发明检测方法不需要昂贵的仪器,样品前处理简单、能现场操作检测,应用广泛,该方法灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的快速检测。

附图说明

[0013] 图 1 为本发明的苯霜灵标准品与抗体的 TR-FIA 标准抑制曲线图。

具体实施方式

实施例

[0014] 1、免疫原与包被原制备

本发明免疫原(苯霜灵-BSA)的合成:准确称取苯霜灵 324mg 溶解在 2mL N,N-二甲基甲酰胺中,搅拌下逐滴加入 γ -氨基丁酸溶液,搅拌反应 3 小时,调节反应液 pH 10 左右。离心除掉沉淀物。将上述反应逐滴加入 BSA 溶液中(320mg BSA 溶解于 5mL 生理盐水),再加入 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 23mg, N,N-二环己基碳二亚胺(DCC) 45.4mg,4 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜,离心除去沉淀,取上清液用磷酸缓冲液(PBS)透析 3 天,每 6 小时更换透析液,将所得产物低压冻干,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用;

包被原(苯霜灵-OVA)的合成:在上述反应中,将 BSA 换成 OVA 后,得到反应偶联物苯霜灵-OVA,该偶联物作为 TR-FIA 检测时作为包被原使用。

[0015] 2、单克隆抗体制备

2.1 动物免疫

用步骤 1 制备的免疫原分别免疫 6 周龄雌性 BaIb/c 小鼠, 每只小鼠的免疫剂量为 100 μ g/0.2mL。首次免疫, 用无菌 0.01mol/L pH7.4 PBS 溶解免疫原(苯霜灵-BSA), 再与等量弗氏完全佐剂混合, 完全乳化, 劲背部皮下分 2~3 点注射; 加强免疫, 用 0.01mol/L pH7.4 PBS 溶解免疫原与等量弗氏完全佐剂混合, 充分乳化, 小鼠腹腔注射。每次间隔 14~21 天, 第 3 次免疫后 7~10 天开始对免疫小鼠尾静脉采血, 收集血清, 用 ELISA 检测小鼠血清效价。末次免疫后间隔 4 周以上, 在细胞融合前 3~4 天, 腹腔注射苯霜灵-BSA 抗原 100 μ g/0.2mL/只, 注射后每天注意观察, 保证融合前小鼠状态良好。

[0016] 2.2 单克隆抗体制备

分离免疫小鼠的脾细胞, 并进行匀浆制备免疫脾细胞。取 1 只免疫的 BaIb/c 小鼠, 从眼眶放血分离血清作为阴性血清, 处死。小鼠用 75% 酒精浸泡 5min, 进行整体消毒。将小鼠四肢固定, 然后用镊子夹住小鼠下腹部皮肤, 剪开一小口, 再用镊子撕开皮肤, 露出腹膜, 换一套镊子和剪刀, 在腹部中央腹膜上用剪刀剪开一小口。换一套镊子和剪刀, 用剪刀剪开腹膜, 露出脾脏, 再换一套器械用镊子夹住脾脏, 用剪刀将脾脏外膜剪破, 然后放入事先灭菌的匀浆器中。加适量基础培养基(RPMI-1640)于匀浆器中, 进行研磨, 挤压出脾细胞, 取出匀浆器的匀浆棒, 再补加适量基础培养基(RPMI-1640), 静置 2min, 将上层细胞液吸取后, 放入腹腔巨噬细胞离心管中, 重复上述操作 1 次。1200r/min 离心 10min, 除去上清。将 10^8 个免疫脾细胞与 $1\sim 2\times 10^7$ 个 SP2/0 骨髓瘤细胞按照 1:10 或 1:5 的比例加入离心管中, 进行混匀, 然后于 1500r/min 水平离心 10min, 弃去上清。将离心管倒扣在灭菌的吸水纸上, 把管中液体吸干。用手指或桌面轻轻敲击管底, 让沉淀的细胞松动, 再把离心管置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中。在 1min 内缓慢将 50% PEG 0.8mL 滴入离心管中, 边加边轻轻用吸管尖搅拌沉淀细胞。再继续搅拌 30s 后, 静置 1min, 然后慢慢加入事先进行 37 $^{\circ}$ C 预温的 40mL 基础培养基(RPMI-1640)。加基础培养基方法为: 第 1min 内逐滴滴入 1mL, 第 2min 内逐滴滴入 2mL, 第 3min 内逐滴滴入 3mL, 第 4min 内逐滴滴入 4mL, 在每次加培养基时需缓慢加入, 并轻轻地搅拌培养基, 最后将剩余的 RPMI-1640 培养基慢慢加入。1000r/min 离心 5min, 除去上清。然后用 HAT 培养基悬浮混合的细胞, 再加入饲养脾细胞。根据需要补加适量的 HAT 培养基, 混合均匀, 再将含有饲养细胞的细胞融合液滴加到 96 孔细胞培养板上, 滴加量约为 150 μ L/孔。将培养板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中, 进行培养。用建立的间接 ELISA 筛选阳性细胞克隆。选择强阳性集落生长的孔, 用有限稀释法进行克隆。并对其他阳性孔, 进行 24 孔扩大培养, 用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 对扩大培养孔的上清液进行检测, 对间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 均为阳性孔的细胞进行液氮冷冻保存。通过融合检测, 并进行 3 次亚克隆后获得杂交瘤细胞株。杂交瘤细胞株经过多次传代、冻存、复苏, 杂交瘤细胞分泌抗体稳定。进行杂交瘤细胞染色体的计数, 将每株杂交瘤细胞随机选择 20 个细胞, 进行细胞染色体条数的计数, 再计算细胞染色体条数的平均值。小鼠脾细胞染色体数为 40 条, SP2/0 细胞的染色体数目平均数为 62~68 条, 而本试验获得的 20 株杂交瘤细胞染色体数目都在 92~103 条之间, 平均为 96.8 条。本杂交瘤细胞染色体数目高于两亲本细胞的染色体数目, 说明是两种细胞的杂交产物。取细胞株细胞分泌的培养上清液, 进行 1:10 稀释后, 用夹心 ELISA 方法测定抗体亚型, 该细胞株分泌的抗体亚型为 IgG1。采用辛酸-硫酸铵法对小鼠腹水进行纯化。该单克隆抗体可用于制备时间分辨荧光检测试剂盒。

[0017] 2.3 单克隆抗体的纯化

采用辛酸-硫酸铵法对小鼠腹水进行纯化:取小鼠腹水 10mL,加入等体积的巴比妥缓冲液,适量的二氧化硅混合,室温振荡 30min。室温静置 15min 后,取上清于洁净离心管中,4℃,1800r/min 离心 20min;取上清液 18mL,加入 36mL 0.06mol/L 醋酸钠缓冲液,用 HCl 调 pH 值至 4.5,充分搅拌下在 30min 内缓慢加入辛酸 297 μ L;继续搅拌 10min,然后转入 4℃ 冰箱静置 2h,4℃,15000r/min 离心 30min,上清液经 0.45 μ m 滤膜过滤后体积为 50mL;加入 5mL 0.1mol/L 的磷酸缓冲液,用 NaOH 调 pH 值至 7.6,搅拌下缓缓加入硫酸铵至终浓度为 0.277g/mL;4℃ 冰箱静置 2h 后,4℃,12000r/min 离心 30min,弃上清;沉淀用 5mL 0.1mol/L 的磷酸缓冲液重悬,装入透析袋,用 5000mL 0.01mol/L pH7.2 PBS 缓冲液充分透析后,再用 2000 mL 蒸馏水透析,最后用 3000mL 三蒸去离子水透析;然后 4℃,12000r/min 离心 30min,弃沉淀,收集上清液,测蛋白浓度。做 SDS-PAGE 电泳,鉴定单克隆抗体的纯度。

[0018] 2.4 兔抗鼠 IgG 抗体的制备

用 Balb/C 小鼠 IgG 免疫健康新西兰大白兔,制备高效价的兔抗鼠 IgG 高免血清,采用饱和硫酸铵沉淀法对血清进行粗提,经 G-200 过柱后得到高纯度的兔抗鼠 IgG。

[0019] 3.1、制备试剂盒和检测样品

取溶解于 50 mmol/L PBS pH7.0 的 5g/L 兔抗鼠抗体 1~2mL,经 PD-10 柱转换缓冲条件,洗脱液为含 0.155mol/L NaCl 的 50 mmol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 pH8.5 缓冲液。收集蛋白峰,经紫外吸收分析定量(1.46A280-0.74A260),用上述洗脱液稀释兔抗鼠抗体至 2g/L。取 500~1000 μ L 稀释后的兔抗鼠抗体加入含 0.2~0.4mg 的 Eu^{3+} - N_2 -[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸(Eu^{3+} -DTTA)的小瓶中,30℃ 磁力搅拌反应 20 小时。反应液经用 80mmol/L Tris-HCl pH7.8 缓冲液平衡的 Sepharose CL-6B 柱(1 \times 40cm)层析, A_{280} 监测收集蛋白峰,稀释分装备用。

[0020] 3.2 包被板固相抗原制备

将苯霜灵-OVA 用 50mmol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 pH9.6 缓冲液稀释至 1mg/L 的包被液,96 孔包被板各孔加 100 μ L,4℃ 放置过夜。弃去包被液,冲洗三次,加 150 μ L 含 3g/L OVA 的上述缓冲液封闭,4℃ 放置过夜。弃去封闭液,真空抽干,板条密封后置 -20℃ 冷冻保存。

[0021] 3.3 试剂的配制

(1) 苯霜灵标准品溶液配制:将苯霜灵标准品,稀释成为 0ng/mL,0.01ng/mL,0.025ng/mL,0.1ng/mL,0.25ng/mL,1ng/mL,2.5ng/mL,10ng/mL,25ng/mL,100ng/mL 系列浓度,稀释液为 0.1mol/L pH7.5 磷酸盐缓冲液;

(2) 缓冲液:8mmol/L NaCl、0.2% OVA、50 μ mol/L 二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、0.1mL/L Tween-80 和 0.1% NaN_3 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8;

(3) 洗涤液为:14.5mmol/L NaCl、0.2mL/L Tween-80 和 0.2% NaN_3 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8;

(4) 增强液的配制:由 15 μ mol β -萘甲酰三氟丙酮、50 μ mol 三正辛基氧化膦和 1mL 曲拉通 X-100 加入 pH3.2 邻苯二甲酸氢钾缓冲液中,再定容至 1L 配制而成。

[0022] 3.4 试剂盒提供的试剂

基于上述制备的试剂,本发明用于检测苯霜灵的时间分辨荧光免疫分析试剂盒包括如下材料:

- (1) 96 孔酶标板 ×1 块；
- (2) 苯霜灵标准品 1mg/mL/ 瓶；
- (3) 抗苯霜灵抗体冻干品, 用时用 0.5 mL 蒸馏水溶解；
- (4) Eu^{3+} - 兔抗鼠抗体冻干品, 用时用 0.5 mL 蒸馏水溶解；
- (5) 增强液 :15mL；
- (6) 10× 洗涤液 :30mL；
- (7) 缓冲液 :30 mL。

[0023] 3.5 测定之前注意事项：

- A. 使用之前将所有试剂回升至室温 (18-30℃)；
- B. 使用之后立即将所有试剂放回 2-8℃；
- C. 如果样品量大建议使用多通道移液器；
- D. 在所有恒温孵育过程中, 避免光线照射, 用盖子盖住微孔；
- E. 取出需用数量的微孔板及框架, 将不用的微孔板放进原锡箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封, 保存于 2-8℃。

[0024] 3.6 具体检测步骤如下：

取苯霜灵 -OVA 板条, 加入 50 μL 的苯霜灵到各自的微孔中, 加 50 μL 以缓冲液稀释的抗苯霜灵抗体, 25℃~37℃振荡 0.5~1 小时, 洗涤液洗 3 次, 加以缓冲液稀释的 100 μL Eu^{3+} -兔抗鼠抗体, 25℃~37℃振荡 0.5~1 小时, 洗涤液洗 6 次, 加 200 μL 增强液振荡 5 分钟后测量荧光强度 cps, 从标准曲线计算样品中的苯霜灵含量。

[0025] 3.7 按下列步骤制备试剂盒和检测苹果、玉米、蔬菜样品：

- (1) 制备试剂盒同实施例；
- (2) 具体检测步骤如下：

取苯霜灵 -OVA 板条, 加入 50 μL 的苯霜灵到各自的微孔中, 加 50 μL 以缓冲液稀释的抗苯霜灵抗体, 25℃~37℃振荡 0.5~1 小时, 洗涤液洗 3 次, 加以缓冲液稀释的 100 μL Eu^{3+} -兔抗鼠抗体, 25℃~37℃振荡 0.5~1 小时, 洗涤液洗 6 次, 加 200 μL 增强液振荡 5 分钟后测量荧光强度 cps, 根据标准曲线计算样品中的苯霜灵含量。

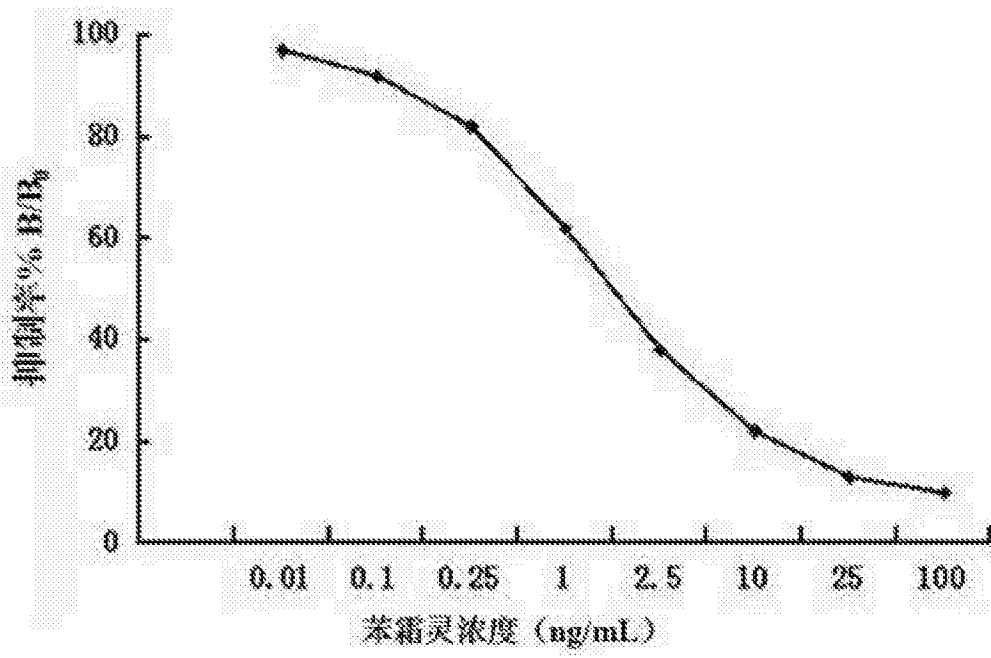


图 1

专利名称(译)	检测苯霜灵的时间分辨荧光免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN106596954A	公开(公告)日	2017-04-26
申请号	CN201510664825.8	申请日	2015-10-15
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	洪霞 杜霞 刘静		
发明人	洪霞 杜霞 刘静		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/533 G01N33/543 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6408 G01N33/531 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测苯霜灵的时间荧光分辨荧光免疫分析试剂盒。所述检测苯霜灵的时间分辨荧光免疫分析检测试剂盒是由多孔包被板、缓冲液、苯霜灵标准品、苯霜灵的抗体冻干品、标记的羊抗鼠抗体、洗涤液和增强液所组成。所述检测苯霜灵的时间荧光免疫分析试剂盒的检测方法包括下列步骤：(1)免疫原的制备；(2)包被原的制备；(3)单克隆抗体的制备；(4)样品的前处理及检测。本发明检测时间短、平均回收率高、样品前处理简单、能现场操作检测，应用广泛，检测成本低，同时具有检测特异性强，批内和批间差异小、灵敏度高和操作简单快速，且特别适合于大批量样品的检测等优点。

