



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105388281 B

(45)授权公告日 2017.09.12

(21)申请号 201510973027.3

(22)申请日 2015.12.23

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105388281 A

(43)申请公布日 2016.03.09

(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 杨昌松 冯静
潘立宁 胡斌 唐纲岭 刘惠民
鲁亚辉

(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 33/535(2006.01)

审查员 胡琴明

权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

检测异菌脲的酶联免疫试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种检测异菌脲的酶联免疫试剂盒,它包括:包被有包被原的酶标板、异菌脲标准品溶液、酶标二抗、异菌脲特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液,所述包被原为异菌脲偶联抗原,所述酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗抗体。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测异菌脲的方法。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测烟叶样本中异菌脲的含量,其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。

1. 一种检测异菌脲酶联免疫试剂盒的制备方法,其特征在于:包括制备包被有包被原的酶标板、异菌脲标准品溶液、酶标二抗、异菌脲特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液,所述包被原为异菌脲偶联抗原,所述酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗抗体,所述异菌脲特异性抗体是以异菌脲偶联抗原作为免疫原制备获得,所述异菌脲特异性抗体为异菌脲单克隆抗体;所述异菌脲偶联抗原是由异菌脲半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为甲状腺蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白,所述异菌脲半抗原的制备方法为:

化合物A的合成:取5.0 g 2,6-二氯-4-硝基苯酚与3.2 g 4-溴丁酸叔丁酯在丙酮中搅拌,再向其中加入2.6 g无水碳酸钾作为催化剂在60℃反应8 h,反应停止后,蒸干溶剂,再加水与乙酸乙酯萃取,并用无水硫酸钠干燥,浓缩,过200-300 目硅胶柱,层析分离纯化,得到化合物A 5.23 g;

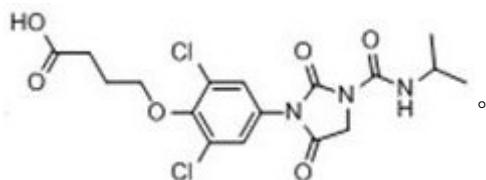
化合物B的合成:向20 mL水中加入3.1 g锌粉和1 mL冰乙酸,在90℃反应30 min,再加入5.2 g化合物A的乙醇溶液80 mL,在60℃反应4 h,待反应停止,抽滤,蒸干,向其中加水与二氯甲烷萃取,静置,用无水硫酸钠干燥,用体积比为石油醚:乙酸乙酯=20:1重结晶,得到化合物B 4.8 g;

化合物C的合成:取4.7 g化合物B用100 mL乙腈溶解,搅拌,向其中加入2.16 g氨基乙酸,在氮气保护下,通入碳酰氯,在50℃下反应7 h,停止反应后,再加入50 mL氢氧化钠水溶液,震荡,旋蒸,除去乙腈,加乙酸乙酯溶解,加水洗涤,浓缩,蒸干,过200-300目硅胶柱,层析分离,得到化合物C 3.57 g;

化合物D的合成:取3.4 g化合物C,用1,2-二氯乙烷溶解,加入0.5 mL DMF、3 mL草酰氯,室温搅拌3 h,旋蒸蒸干,除去有机溶剂,加入80 mL吡啶,在80℃反应7 h,停止反应,冷却到室温,旋蒸,除去吡啶,加入体积比为乙醇:石油醚=10:3的溶剂加热溶解,于4℃放置过夜,抽滤,得到化合物D 2.97 g;

化合物E的合成:取2.8 g 化合物D加入200 mL二氯乙烷中溶解,再加入2.7 mL异丙胺,通入氮气,排出空气,通入碳酰氯,室温搅拌反应6 h,停止反应,加入50 mL氢氧化钾水溶液震荡,静置,分离出有机相,水洗,用无水硫酸钠干燥蒸干,过200-300目硅胶柱,用体积比为石油醚:乙酸乙酯=1:1的溶剂洗脱分离,得到化合物E 1.53 g;

化合物F的合成:取1.53 g化合物E,加入100 mL 70%甲酸水溶液溶解,于70℃搅拌反应6 h,停止反应,旋蒸,除去溶剂,加氢氧化钠水溶液,加乙酸乙酯萃取,分去有机相,水相调节pH值到4,加1,2-二氯乙烷萃取,水洗,干燥,蒸干,用体积比为乙醇:正己烷=6:4的溶剂重结晶,得到异菌脲半抗原0.81 g,其分子结构式为:



2. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于:所述酶标二抗的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,当标记酶为辣根过氧化物酶时,底物显色液由A液和B液组成,A液为过氧化氢或过氧化脲,B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,终止液为2 mol/L的硫酸或盐酸缓冲液;当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时,底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液,终止

液为2 mol/L硫酸。

3.如权利要求1 所述的制备方法,其特征在于:所述洗涤液为pH值为7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01‰~0.03‰叠氮化钠防腐剂、0.1~0.3 mol/L的磷酸盐缓冲液;所述复溶液为pH值为7.0、0.02 mol/L的磷酸盐缓冲液,洗涤液中的百分比为重量体积百分比,单位g/mL。

4.如权利要求1 所述的制备方法,其特征在于:所述异菌脲标准品溶液的浓度分别为0 μg/L、0.5 μg/L、1.5 μg/L、4.5 μg/L、13.5 μg/L、40.5 μg/L。

5.一种利用权利要求1-4任一项所述的制备方法制备的试剂盒检测烟叶样品中异菌脲含量的方法,其特征在于:包括步骤:

- (1) 样品前处理;
- (2) 用试剂盒进行检测;
- (3) 分析检测结果。

检测异菌脲的酶联免疫试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术,具体涉及一种用于检测异菌脲的酶联免疫试剂盒及其应用,可定性、定量检测烟叶中异菌脲的残留量。

背景技术

[0002] 异菌脲,又名扑海因,分子式为 $C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$,属于二甲酰亚胺类,是一种广谱性触杀型保护性杀菌剂,广泛应用于烟草、果树、蔬菜的病害防治和水果的贮藏保鲜。异菌脲可以通过根部吸收起内吸作用,可有效防治对苯并咪唑类内吸杀菌剂有抗性的真菌。其主要防治对象为由葡萄孢菌、交链孢菌、核盘菌等引起的病害,如灰霉病、早疫病、黑斑病、菌核病等。异菌脲农药是日本、美国、韩国、澳大利亚、加拿大和食品法典委员会国有限量要求的检测项目,其在各类食品中最高残留限量为0.05~15 mg/kg。目前,异菌脲的检测方法大多为液相色谱法和气相色谱法,所能检测的基质种类较少,对烟草中异菌脲的检测方法的相关专利和文献报道也较少。

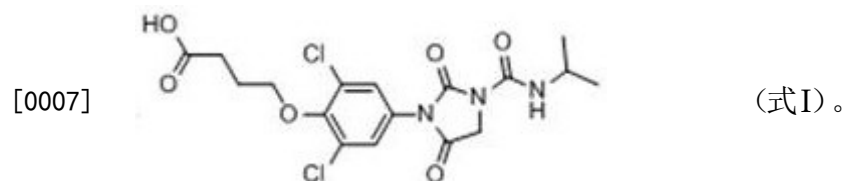
发明内容

[0003] 本发明的目的正是基于上述现有技术状况而提供一种能够检测烟草中异菌脲药物残留量的酶联免疫试剂盒,并提供一种高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检测方法,应用本发明的酶联免疫法测定烟草中异菌脲的残留量,具有特异性好、操作简单、检测快速、检测成本低等优点。

[0004] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:本发明试剂盒包括:包被有包被原的酶标板、异菌脲标准品溶液、酶标二抗、异菌脲特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液,所述包被原为异菌脲偶联抗原,所述包被原由异菌脲半抗原与载体蛋白偶联制备得到,所述酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗抗体,所述异菌脲半抗原是由2,6-二氯-4-硝基苯酚为起始原料,经过与4-溴丁酸叔丁酯的烃基化反应得到羟基2,6-二氯-4-硝基苯,还原硝基后,得到烃基2,6-二氯苯胺,烃基2,6-二氯苯胺在碳酰氯的作用下,与氨基乙酸缩合,得到烃基2,6-二氯苯甘氨酸酯,再经过成环反应,得到异菌脲主体结构化合物,该化合物再经碳酰氯作用,与异丙胺缩合,得到异菌脲母核结构化合物,在酸性条件下水解反应得到的。

[0005] 所述载体蛋白可为甲状腺蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白。

[0006] 所述异菌脲半抗原的分子结构如式I:



[0008] 所述异菌脲特异性抗体是以异菌脲偶联抗原作为免疫原制备获得,所述异菌脲特异性抗体为异菌脲单克隆抗体。

[0009] 所述酶标记的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,当标记酶为辣根过氧化物酶时,底物显色液A液为过氧化氢或过氧化脲,底物显色液B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,终止液为2 mol/L的硫酸或盐酸缓冲液;当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时,底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液,终止液为2 mol/L硫酸。

[0010] 所述洗涤液pH值为7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01%~0.03%叠氮化钠防腐剂、0.1~0.3 mol/L的磷酸盐缓冲液;其中的百分比为重量体积百分比,单位g/mL。

[0011] 所述复溶液为pH值为7.0、0.02 mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0012] 所述异菌脲标准品溶液的浓度分别为0 $\mu\text{g/L}$ 、0.5 $\mu\text{g/L}$ 、1.5 $\mu\text{g/L}$ 、4.5 $\mu\text{g/L}$ 、13.5 $\mu\text{g/L}$ 、40.5 $\mu\text{g/L}$ 。

[0013] 其中在酶标板制备过程中所用到的包被缓冲液为pH值为9.6,0.05 mol/L的碳酸盐缓冲液,封闭液为pH值为7.1~7.5,含有1%~3% (g/mL) 酪蛋白、0.1~0.3 mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0014] 本发明中酶标板的制备过程为:用包被缓冲液将包被原稀释成20 $\mu\text{g/mL}$,每孔加入100 μL ,25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育2 h或4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,倾去孔中液体,用洗涤液洗涤2次,每次30 s,拍干,然后在每孔中加入150~200 μL 封闭液,25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育1~2 h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0015] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测异菌脲的方法,它包括步骤:

[0016] (1)样品前处理;

[0017] (2)用试剂盒进行检测;

[0018] (3)分析检测结果。

[0019] 本发明检测异菌脲的酶联免疫试剂盒检测原理为:采用间接竞争ELISA方法,在酶标板微孔条上预包被偶联抗原,样本中残留的异菌脲与微孔条上预包被的偶联抗原竞争抗异菌脲的抗体,加入酶标二抗后,用TMB底物显色,样本吸光值与其所含异菌脲的含量成负相关,与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数,即可定性或定量检测出样品中异菌脲的残留量。本发明的试剂盒通过对2,6-二氯-4-硝基苯酚进行结构改造,合成了带有四个碳链长度的羧基半抗原,突出了异菌脲本身的分子结构,增强了免疫原性,使得制备得到的异菌脲单克隆抗体灵敏度高,特异性强,试剂盒对样品的前处理方法简单,无需用到有机溶剂,样品处理过程环保,能快速检测大批量样品;主要试剂以工作液的形式提供,检验方法方便易行,便于携带,试剂盒具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高、操作简单、检测时间短、检测成本低等特点适于大批量烟草样品的定性、定量筛查。

附图说明

[0020] 图1为异菌脲半抗原合成路线图;

[0021] 图2为试剂盒标准曲线图。

具体实施方式

[0022] 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。

[0023] 实施例1 试剂盒组分的制备

[0024] 1、异菌脲半抗原的制备

[0025] 化合物a的合成:取5.0 g 2,6-二氯-4-硝基苯酚与3.2 g 4-溴丁酸叔丁酯在丙酮中搅拌,再向其中加入2.6 g无水碳酸钾作为催化剂在60℃反应8 h,反应停止后,蒸干溶剂,再加水与乙酸乙酯萃取,并用无水硫酸钠干燥,浓缩,过200-300目硅胶柱,层析分离纯化,得到化合物a 5.23 g,收率87%。¹H NMR(CDC13,300MHZ) δ : 7.945 (1H, d, J=0.000), 4.144 (2H, t, J=7.500), 7.945 (1H, d, J=0.000), 1.973 (2H, tt, J=7.500, J=7.367), 2.359 (2H, t, J=7.367), 1.414 (3H), 1.414 (3H), 1.414 (3H,s)。

[0026] 化合物b的合成:向20 mL水中加入3.1 g锌粉和1 mL冰乙酸,在90℃反应30 min,再加入5.2 g化合物a的乙醇溶液80 mL,在60℃反应4 h,待反应停止,抽滤,蒸干,向其中加水与二氯甲烷萃取,静置,用无水硫酸钠干燥,用体积比为石油醚:乙酸乙酯=20:1重结晶,得到化合物b 4.8 g,收率91%。¹H NMR(CDC13,300MHZ) δ :6.898 (1H, d, J=0.000), 4.039 (2H, t, J=7.500), 6.898 (1H, d, J=0.000), 1.965 (2H, tt, J=7.500, J=7.367), 2.361 (2H, t, J=7.367), 1.414 (3H), 1.414 (3H,s), 1.414 (3H,s)。

[0027] 化合物c的合成:取4.7 g化合物b用100 mL乙腈溶解,搅拌,向其中加入2.16 g氨基乙酸,在氮气保护下,通入碳酰氯,在50℃下反应7 h,停止反应后,再加入50 mL氢氧化钠水溶液,震荡,旋蒸,除去乙腈,加乙酸乙酯溶解,加水洗涤,浓缩,蒸干,过200—300目硅胶柱,层析分离,得到化合物c 3.57 g,收率73%。¹H NMR(CDC13, 300MHZ) δ :7.536 (1H, d, J=0.000), 4.037 (2H, t, J=7.500), 7.535 (1H, d, J=0.000), 1.968 (2H, tt, J=7.500, J=7.367), 2.362 (2H, t, J=7.367), 3.751 (2H,s), 1.414 (3H,s), 1.414 (3H,s), 1.414 (3H,s)。

[0028] 化合物D的合成:取3.4 g化合物c,用1,2-二氯乙烷溶解,加入0.5 mL DMF、3 mL草酰氯,室温搅拌3 h,旋蒸蒸干,除去有机溶剂,加入80 mL吡啶,在80℃反应7 h。停止反应,冷却到室温,旋蒸,除去吡啶,加入体积比为乙醇:石油醚=10:3的溶剂加热溶解,于4℃放置过夜,抽滤,得到化合物d 2.97 g,收率82%。¹H NMR(CDC13,300MHZ) δ :7.439 (1H, d, J=0.000), 4.044 (2H, t, J=7.500), 7.439 (1H, d, J=0.000), 1.969 (2H, tt, J=7.500, J=7.367), 2.362 (2H, t, J=7.367), 4.191 (1H, d, J=17.742), 4.196 (1H, d, J=17.742), 1.414 (3H,s), 1.414 (3H,s), 1.414 (3H,s)。

[0029] 化合物e的合成:取2.8 g化合物d加入200 mL二氯乙烷中溶解,再加入2.7 mL异丙胺,通入氮气,排出空气,通入碳酰氯,室温搅拌反应6 h,停止反应,加入50 mL氢氧化钾水溶液震荡,静置,分离出有机相,水洗,用无水硫酸钠干燥蒸干,过200—300目硅胶柱,用体积比为石油醚:乙酸乙酯=1:1的溶剂洗脱分离,得到化合物e 1.53 g,收率64%。¹H NMR(CDC13,300MHZ) δ :7.441 (1H, d, J=0.000), 4.044 (2H, t, J=7.500), 7.441 (1H, d, J=0.000), 1.970 (2H, tt, J=7.500, J=7.367), 2.362 (2H, t, J=7.367), 4.527 (1H, d, J=0.000), 4.528 (1H, d, J=0.000), 4.214 (1H, hept, J=6.794), 1.414 (3H,s), 1.414 (3H,s), 1.414 (3H,s), 1.169 3H, d, J=6.794), 1.169 (3H, d, J=6.794)。

[0030] 化合物f的合成:取1.53 g化合物,加入100 mL70%甲酸水溶液溶解,于70℃搅拌反应6 h,停止反应,旋蒸,除去溶剂,加氢氧化钠水溶液,加乙酸乙酯萃取,分去有机相,水相调节PH值到4,加1,2-二氯乙烷萃取,水洗,干燥,蒸干,用体积比为乙醇:正己烷=6:4的溶剂

重结晶,得到异菌脲半抗原0.81 g,收率77%。¹H NMR(CDC13,300MHZ) δ : 11.0 (1H, s) 7.4 (1H, d, J=0.000), 4.0 (2H, t, J=7.500), 7.4 (1H, d, J=0.000), 1.9 (2H, tt, J=7.500, J=7.367), 2.4 (2H, t, J=7.367), 4.5 (1H, d, J=0.000), 4.5 (1H, d, J=0.000), 4.2 (1H, hept, J=6.794), 1.1 (3H, d, J=6.794), 1.1 (3H, d, J=6.794)。

[0031] 取上述产物经核磁共振氢谱测定,化学位移 δ =11.0的为羧基氢, δ =4.0、1.9、2.4的为间隔臂上亚甲基的氢的共振吸收峰,这些峰在存在配合其他异菌脲氢固有吸收峰的存在证明半抗原合成成功。

[0032] 2、异菌脲偶联抗原的制备

[0033] 免疫原制备——异菌脲半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

[0034] 取9.0 mg异菌脲半抗原,溶解于1.0 mL的二甲基甲酰胺(DMF)中,得到溶液I;取30 mg碳化二亚胺(EDC)和30 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)用0.2 mL水溶解后加入溶液I,室温下搅拌24 h,得到反应液II;取50 mL牛血清白蛋白(BSA),充分溶解在3.8 mL的磷酸盐缓冲液PBS(pH为7.2)中,将反应液II逐滴缓慢滴加到牛血清白蛋白溶液中,并于室温下搅拌24 h,得到反应液III;用0.01mol/L的PBS在4℃透析3天,以除去未反应的小分子物质,得到免疫原;于-20℃保存备用。

[0035] 异菌脲半抗原与血蓝蛋白偶联得到免疫原。

[0036] 称取血蓝蛋白50 mg,使之充分溶解在3.8 mL 0.1M的磷酸盐缓冲液PBS(PH 7.2)中,得到溶液A;取30 mg碳化二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)用0.2 mL水充分溶解后于加入溶液A中,室温下搅拌30 min。取3mg半抗原,溶解于1 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,然后缓慢加入到蛋白溶解中,室温搅拌反应24 h。用0.01 mol/L PBS 4℃透析3 d每天换3次透析液。分装,于-20℃保存备用。

[0037] 异菌脲半抗原与甲状腺蛋白偶联得到免疫原。

[0038] 称取甲状腺蛋白50 mg,使之充分溶解在3.8 mL 0.1M的磷酸盐缓冲液PBS(PH 7.2)中,得到溶液A;取30 mg碳化二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)用0.2 mL水充分溶解后于加入溶液A中,室温下搅拌30 min。取4mg半抗原,溶解于1 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,然后缓慢加入到蛋白溶解中,室温搅拌反应24 h。用0.01 mol/L PBS 4℃透析3 d每天换3次透析液。分装,于-20℃保存备用。

[0039] 包被原制备——异菌脲半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0040] 取7.0 mg异菌脲半抗原,溶解于1.0 mL的二甲基甲酰胺(DMF)中,得到反应液I;取30 mg碳化二亚胺(EDC)和30mg的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)用0.2 mL水充分溶解后加入至反应液I中,室温下搅拌24 h,得到反应液II;取50 mL卵清白蛋白(OVA),充分溶解在3.8 mL的磷酸盐缓冲液PBS(pH为7.2)中,将反应液II逐滴缓慢滴加到卵清白蛋白溶液中,并于室温下搅拌24 h,得到反应液III;用0.01 mol/L的PBS在将反应液III 4℃透析3天,以除去未反应的小分子物质,得到包被原;于-20℃保存备用。

[0041] 异菌脲半抗原与人血清白蛋白偶联得到包被原。

[0042] 称取人血清白蛋白50 mg,使之充分溶解在3.8 mL 0.1M PBS(PH 7.2)中,得到溶液B;取30mg EDC和NHS用0.2 mL水充分溶解后于加入溶液B中,室温下搅拌30 min。取9mg半抗原,溶解于1mL DMF中,然后缓慢加入到蛋白溶解中,室温搅拌反应24 h。用0.01 mol/L PBS 4℃透析3 d每天换3次透析液。分装,于-20℃保存备用。

[0043] 异菌脲半抗原与兔血清白蛋白偶联得到包被原。

[0044] 称取兔血清白蛋白50 mg,使之充分溶解在3.8 mL 0.1M PBS(PH 7.2)中,得到溶液B;取30mg EDC和NHS用0.2 mL水充分溶解后于加入溶液B中,室温下搅拌30 min。取9mg半抗原,溶解于1mL DMF中,然后缓慢加入到蛋白溶解中,室温搅拌反应24 h。用0.01 mol/L PBS 4℃透析3 d每天换3次透析液。分装,于-20℃保存备用。

[0045] 3、异菌脲单克隆抗体的制备

[0046] 动物免疫:将上述步骤得到的免疫原注入到Balb/c小鼠体内,免疫剂量为150 μg/只,使其产生抗血清。

[0047] 细胞融合和克隆化:小鼠血清测定结果较高后,取其脾细胞,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,直到得到分泌异菌脲单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0048] 细胞冻存和复苏:将单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 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。

[0049] 单克隆抗体的生产与纯化:将Balb/c小鼠腹腔注入灭菌石蜡油0.5 mL/只,7天后腹腔注射稳定的单克隆杂交瘤细胞株 5×10^5 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,-20℃保存。

[0050] 4、酶标二体的制备

[0051] 将羊抗鼠抗抗体与辣根过氧化物酶(HRP)采用改良后的过碘酸钠法进行偶联。

[0052] 5、酶标板的制备

[0053] 用包被缓冲液将包被原稀释成20 μg/mL,每孔加入100 μL,25℃避光孵育2 h,倾去孔中液体,用洗涤液洗涤2次,每次30 s,拍干,然后在每孔中加入200 μL封闭液,25℃避光孵育2 h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0054] 实施例2 检测异菌脲的酶联免疫试剂盒的组建

[0055] 组建检测异菌脲的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

[0056] (1)包被异菌脲偶联抗原的酶标板;

[0057] (2)异菌脲标准品溶液6瓶,浓度分别为0 μg/L、4 μg/L、12 μg/L、36 μg/L、108 μg/L、324 μg/L;

[0058] (3)用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;

[0059] (4)异菌脲特异性抗体;

[0060] (5)底物显色液由A液和B液组成,A液为过氧化脲,B液为四甲基联苯胺;

[0061] (6)终止液为2 mol/L硫酸;

[0062] (7)洗涤液为pH值为7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01%~0.03%叠氮化钠防腐剂、0.1~0.3 mol/L的磷酸盐缓冲液,其中百分比为重量体积百分比;

[0063] (8)复溶液为pH值为7.0、0.02 mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0064] 实施例3 烟叶中异菌脲的检测

[0065] 1、样品前处理

[0066] 称取 1.0 ± 0.05 g烟叶样本至50 mL聚苯乙烯离心管中,加入10 mL烟叶提取液(量取100 mL甲醇,加入100 mL去离子水,充分混匀);用匀浆机将其充分打碎;将打碎的样本用

滤膜进行过滤;移取滤液200 mL加入800 mL复溶液,充分混匀;取50 mL用于分析。

[0067] 2、用试剂盒检测

[0068] 加标准品/样本50 μ L 到对应的微孔中,再加入抗体工作液50 μ L /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30 min。小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液250 μ L /孔,充分洗涤4~5次,每次间隔10 s,用吸水纸拍干。加入酶标二抗100 μ L /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30 min。小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液250 μ L /孔,充分洗涤4~5次,每次间隔10 s,用吸水纸拍干。加入底物液A液50 μ L /孔,再加入底物液B液50 μ L /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃(77°F)避光环境中反应15 min。加入终止液50 μ L /孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450 nm处,参比波长620 nm,测定每孔OD值。

[0069] 3、检测结果分析

[0070] 标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准品(0标准)的吸光度值的平均值,再乘以100%,得到标准品或样本的百分吸光度值。以标准品百分吸光率为纵坐标,以异菌脲标准品浓度(μ g/L)的对数为横坐标,绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中异菌脲的实际浓度。

[0071] 实施例4 异菌脲技术参数的确定试验

[0072] 1、试剂盒灵敏度和检测限

[0073] 按照常规方法测定试剂盒灵敏度,标准曲线的范围为4~324 μ g/L,IC₅₀(50%抑制浓度)浮动范围为10~30 μ g/L;对20份样品进行检测,从标准曲线上查出对应于各百分吸光度值的浓度,以20份样本浓度的平均值加上3倍标准差表示检测限,结果显示,该方法对烟叶的检测限均为200 μ g/kg。

[0074] 2、样本精密度和准确度试验

[0075] 以回收率作为准确度评价指标,重复测定某一浓度样品的检测结果相对标准偏差(RSD%)作为精密度评价指标。计算公式为:回收率(%)=实际测定值/理论值 $\times$ 100%,其中理论值为样品的添加浓度;相对标准偏差RSD%=SD/X $\times$ 100%,其中SD为标准偏差,X为测定数据的平均值。

[0076] 按200 μ g/kg、400 μ g/kg两个浓度的异菌脲分别对烟叶样品进行添加回收测定,每个样品做4个平行,用三批不同试剂进行测定,计算样品的平均回收率及精密度结果见下表。

[0077] 表1 烟叶样本精密度及准确度试验

异菌脲	添加浓度(μ g/kg)	回收率 (n=4)%	批内RSD(n=4)%	批间RSD(n=3)%
烟叶	200	87.8	8.4	8.9
	400	97.6	7.6	8.1

[0079] 以200 μ g/kg、400 μ g/kg两个浓度的异菌脲分别对烟叶进行添加,平均回收率在87.8%~97.6%之间;批内、批间相对标准偏差均小于10%。

[0080] 3、试剂盒稳定性试验

[0081] 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、异菌脲添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在37℃保存条件下放置7天,进行加速老化实验,结果表明该试剂盒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7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℃至少保存12个月以上。

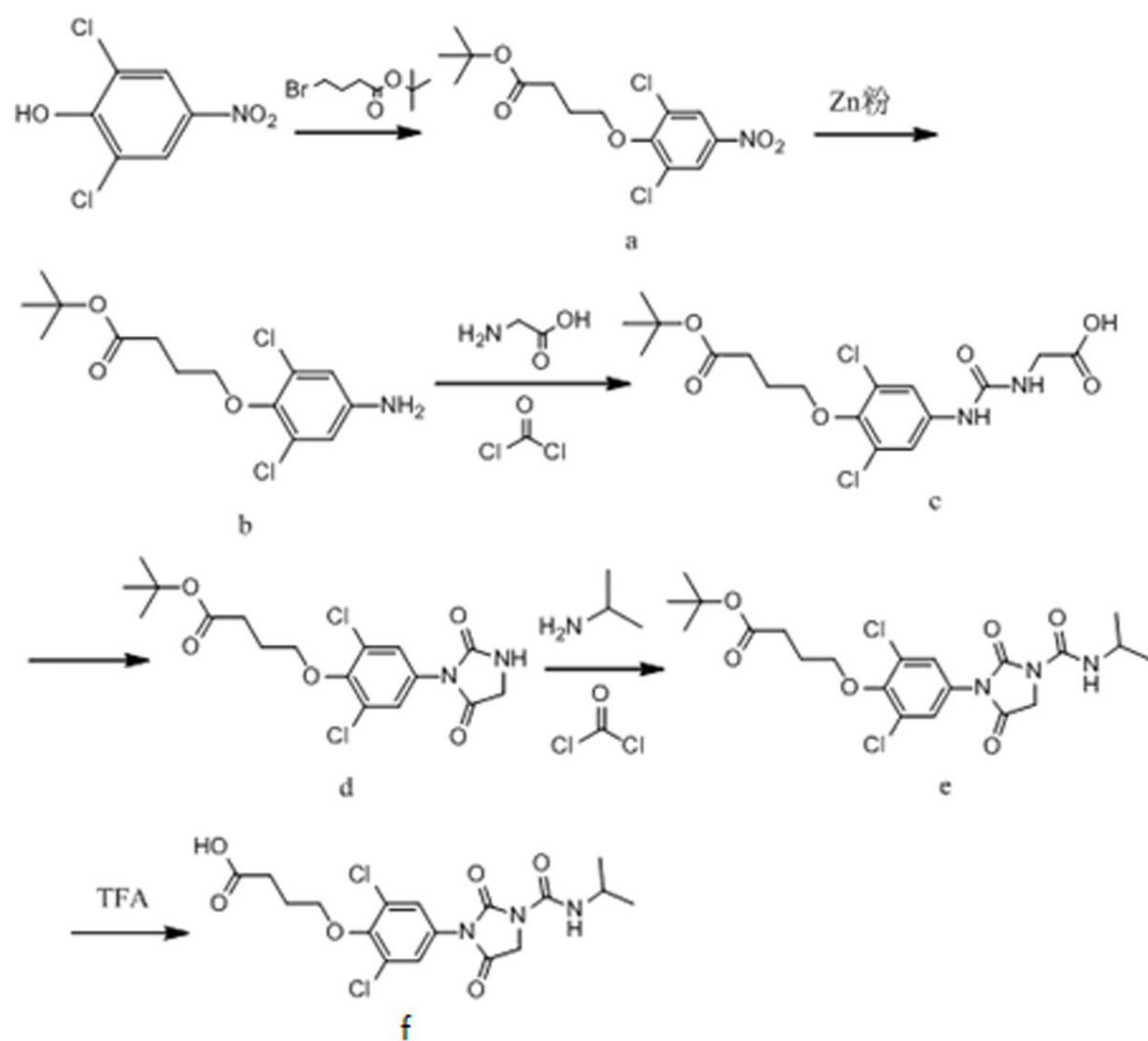


图1

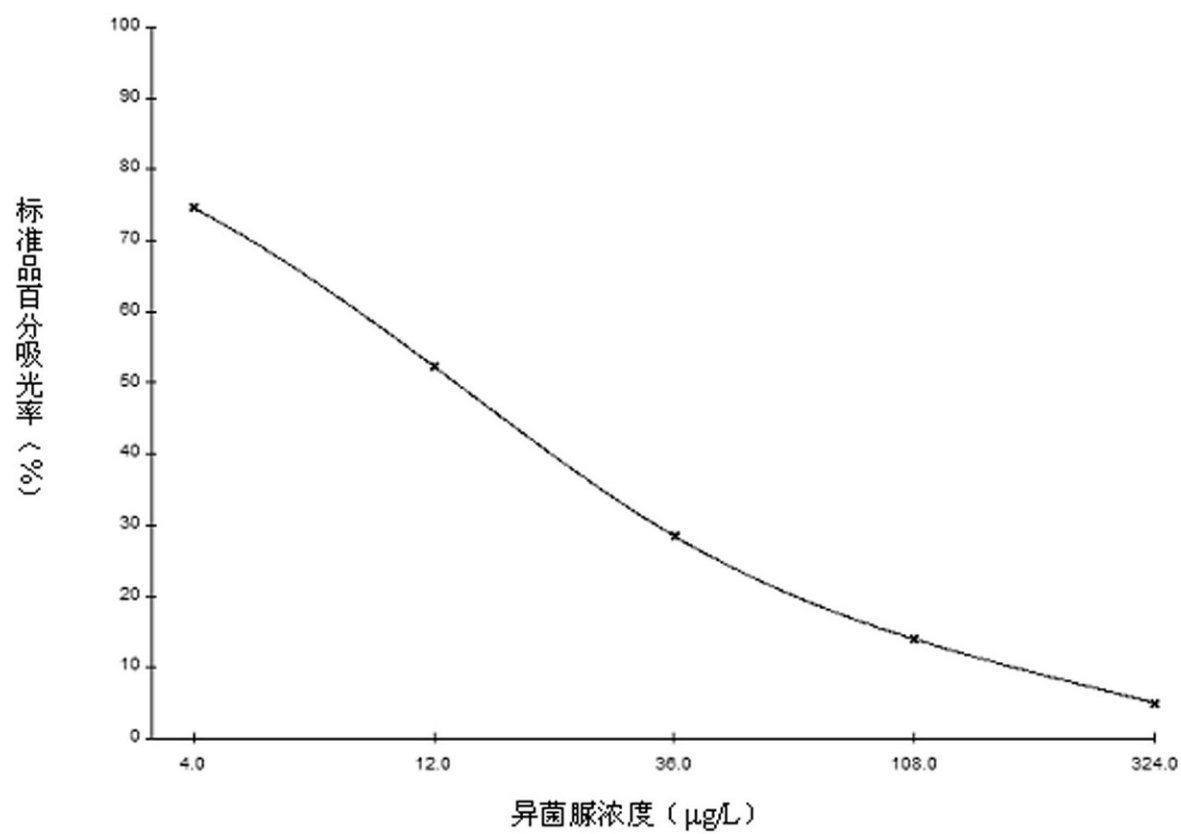


图2

专利名称(译)	检测异菌脲的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN105388281B	公开(公告)日	2017-09-12
申请号	CN201510973027.3	申请日	2015-12-23
[标]申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院 国家烟草质量监督检验中心 北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院 国家烟草质量监督检验中心 北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院 国家烟草质量监督检验中心 北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	陈黎 范子彦 杨昌松 冯静 潘立宁 胡斌 唐纲岭 刘惠民 鲁亚辉		
发明人	陈黎 范子彦 杨昌松 冯静 潘立宁 胡斌 唐纲岭 刘惠民 鲁亚辉		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	姜振东		
其他公开文献	CN105388281A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测异菌脲的酶联免疫试剂盒，它包括：包被有包被原的酶标板、异菌脲标准品溶液、酶标二抗、异菌脲特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液，所述包被原为异菌脲偶联抗原，所述酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗体。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测异菌脲的方法。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测烟叶样本中异菌脲的含量，其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。

