



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108205060 A

(43)申请公布日 2018.06.26

(21)申请号 201611164047.7

(22)申请日 2016.12.16

(71)申请人 镇江亿特生物科技发展有限公司
地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯经十
二路668号

(72)发明人 洪霞 刘静 立雯馨

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

G01N 1/34(2006.01)

G01N 1/38(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

检测烯酰吗啉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烯酰吗啉的酶联免疫试剂盒,它含有:包被有烯酰吗啉偶联抗原的酶标板,烯酰吗啉标准品溶液,浓缩酶结合物,酶结合物工作液,底物显色液,终止液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测样本中烯酰吗啉的方法,它包括:首先进行样本前处理,然后用试剂盒进行检测,最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测蔬菜(原料、配合料和浓缩料)样本中烯酰吗啉的残留量,其操作简便、成本低、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。

1. 一种检测烯酰吗啉的酶联免疫检测试剂盒,其特征包括有:

- (1) 包被有烯酰吗啉偶联抗原的酶标板;
- (2) 烯酰吗啉标准品溶液;
- (3) 浓缩酶结合物;
- (4) 酶结合物稀释液;
- (5) 底物显色液;
- (6) 终止液。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述烯酰吗啉偶联抗原是由烯酰吗啉半抗原与载体蛋白偶联得到。

3. 如权利要求2所述的试剂盒,其特征在于所述烯酰吗啉半抗原的制备方法主要包括如下步骤:

- 1) 取20 mg烯酰吗啉,10 μ l,1,3-丙二胺,催化量的4-二甲氨基吡啶溶解于2ml N,N'-二甲基甲酰胺中,得到I液;
- 2) 取20mg N,N'-二环己基碳二亚胺溶解于0.5mlDMF中,得到II液;
- 3) 在0 $^{\circ}$ C条件下,将II液缓慢滴加至I液中,恢复室温后,继续反应20 h;
- 4) 蒸除溶剂,柱层析(洗脱液:二氯甲烷/甲醇,体积比20:1),得到烯酰吗啉半抗原。

4. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述的浓缩酶结合物为酶标记的烯酰吗啉单克隆抗体。

5. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述浓缩酶结合物的标记酶为辣根过氧化物酶;酶结合物是采用过碘酸钠法将酶标记物与抗体偶联得到。

6. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述的终止液为1~2mol/L的硫酸或盐酸溶液,所述底物显色液由底物液A液和底物液B液组成,底物液A液为过氧化脲溶液,底物液B液为四甲基联苯胺溶液。

7. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所用包被缓冲液为PH9.6,0.1mol/L碳酸盐缓冲液,所用封闭液为PH7.2~7.4,0.5%~1%牛血清白蛋白,0.1mol/L磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

8. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述的酶结合物稀释液为PH7.2~7.4,含0.5%~1%牛血清白蛋白,0.1mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重最百分比。

9. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在r所述烯酰吗啉标准品溶液浓度分别为0 μ g/L、1 μ g/L、3 μ g/L、9 μ g/L、27 μ g/L、81 μ g/L。

10. 一种检测样品中烯酰吗啉含量的方法,主要步骤包括:

- 1) 将待测样品进行前处理;
- 2) 用权利要求1—9任意一项所述的酶联免疫试剂盒进行检测;
- 3) 分析检测结果。

检测烯酰吗啉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烯酰吗啉的酶联免疫试剂盒,其适用于蔬菜中烯酰吗啉测定。

技术背景

[0002] 烯酰吗啉为专一杀卵菌纲真菌杀菌剂,对霜霉属和疫霉属真菌病害防治效果显著,是我国当前广泛使用的杀菌剂之一。目前烯酰吗啉为主要成分的农药制剂在我国主要登记的作物有黄瓜、葡萄,用于防治霜霉病;于辣椒、甜瓜、马铃薯、甘蓝、番茄、烟草等作物登记的制剂较少,主要用于防治这些作物中的疫病和霜霉病,烟草中则为黑胫病。烯酰吗啉属低毒农药,但其使用广泛,农残水平受到关注。目前部分国家和区域食品安全规范对烯酰吗啉的最大残留限量做了规定,烯酰吗啉在部分作物之间的MRL值差别非常大,且有些作物的MRL值相对较低,对检测技术要求较高而我国尚无烯酰吗啉残留的标准分析方法和MRL值规定,这使该农药是否存在不合理使用以及是否在产品中的残留损害消费者健康等重要信息没有统一可靠的判断依据和方法。近年来文献报道的烯酰吗啉残留检测方法多采用色谱分析,主要有气相色谱、液相色谱法,气质、液质联用法,本文阐述了一种较为方便的酶联免疫分析方法,将大为提高检测的效率。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种用于烯酰吗啉含量测定的酶联免疫试剂盒,其操作简单,适合现场大批量样品的筛选。

[0004] 本发明试剂盒,它包括:

- (1) 包被有烯酰吗啉偶联抗原的酶标板;
- (2) 烯酰吗啉标准品溶液;
- (3) 浓缩酶结合物;
- (4) 酶结合物稀释液;
- (5) 底物显色液;
- (6) 终止液。

[0005] 所述烯酰吗啉偶联抗原为烯酰吗啉半抗原与载体蛋白的偶联物,所述载体蛋白可为卵清蛋白、牛血清白蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、鼠血清蛋白、人血清蛋白。

[0006] 所述烯酰吗啉半抗原制备过程:

- 1) 取20mg烯酰吗啉,10 μ l,1,3-丙二胺,催化量的4-二甲氨基吡啶溶解于2ml N,N'-二甲基甲酰胺中,得到I液;
- 2) 取20mg N,N'-二环己基碳二亚胺溶解于0.5mlDMF中,得到II液;
- 3) 在0 $^{\circ}$ C条件下,将II液缓慢滴加至I液中,恢复室温后,继续反应20 h;
- 4) 蒸除溶剂,柱层析(洗脱液:二氯甲烷/甲醇,体积比20:1),得到烯酰吗啉半抗原。

[0007] 所述浓缩酶结合物为酶标记的烯酰吗啉单克隆抗体,所述标记酶为辣根过氧化物

酶;酶结合物是采用过碘酸钠法将标记酶与抗体进行偶联得到的。

[0008] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括烯酰吗啉标准品溶液、酶结合物稀释液、底物显色液、终止液。

[0009] 所述的终止液为1~2mol/L的硫酸或盐酸溶液,所述底物显色液由底物液A液和底物液B液组成,底物液A液为过氧化脲溶液,底物液B液为四甲基联苯胺溶液。

[0010] 所述的酶结合物稀释液为PH7.2~7.4,0.5%~1%牛血清白蛋白,0.1mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

[0011] 其中酶标板在制备过程中所用的包被缓冲液为pH9.6,0.1mol/L碳酸盐缓冲液,所用封闭液为PH7.2~7.4,0.5%~1%牛血清白蛋白,0.1mol/L磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

[0012] 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0.1~0.2ug/ml,每孔加入100 u1,37℃温育2h或4℃过夜,倾去包被液,用洗涤液洗涤2次,每次30s,拍干,然后在每孔中加入150~200u1封闭液,37℃温育1~2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0013] 本发明的检测原理为:

当在微孔条上预包被烯酰吗啉偶联抗原,加入样本溶液或标准品溶液后,样本中残留的烯酰吗啉与酶标板上预包被的烯酰吗啉偶联抗原竞争烯酰吗啉的酶结合物,用底物显色液显色,样本吸光值与所含烯酰吗啉的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中烯酰吗啉的含量。同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的烯酰吗啉标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中烯酰吗啉的浓度范围。

[0014] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒烯酰吗啉的方法,它包括步骤:

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

[0015] 本发明检测烯酰吗啉的酶联免疫试剂盒主要采用竞争ELISA方法检测样品中烯酰吗啉的含量;对样品的前处理要求低,样品前处理过程简单,能同时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,具有特异性高、灵敏度高、准确度高、精确度高等特点。本发明的酶联免疫试剂盒,携带便利、使用方便、结构简单、检测方法快速、简便、适于大批量样品筛选。

附图说明

[0016] 图1试剂盒的标准曲线图。

具体实施方式

[0017] 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。

[0018] 实施例1 试剂盒组分的制备

1、烯酰吗啉半抗原制备

- 1) 取20mg烯酰吗啉,10u1,1,3-丙二胺,催化量的4-二甲氨基吡啶溶解于2mlN,N'-二甲

基甲酰胺中,得到I液;

2) 取20mg N,N'-二环己基碳二亚胺溶解于0.5ml DMF中,得到II液;

3) 在0℃条件下,将II液缓慢滴加至I液中,恢复室温后,继续反应20 h;

4) 蒸除溶剂,柱层析(洗脱液:二氯甲烷/甲醇,体积比20:1),得到烯酰吗啉半抗原,如图1。

[0019] 2、抗原的制备

免疫原制备——烯酰吗啉半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

[0020] 1) 取烯酰吗啉半抗原5.3mg用0.5ml DMF溶解,得到I液;

2) 取BSA 30mg用2.0ml, pH7.0, 0.1mol/L磷酸盐缓冲液溶解,得到II液;

3) 取碳化二业胺(EDC) 10mg用0.5ml, pH7.0, 0.1mol/L磷酸盐缓冲液溶解,得到III液;

4) 将I液与 II液混合,在搅拌下缓慢滴加入III液,室温反应2小时,4℃透析二天,每天换液三次,得到免疫原。

[0021] 包被原制备——烯酰吗啉半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0022] 1) 取烯酰吗啉半抗原5.3mg用0.5ml DMF溶解,得到I液;

2) 取OVA 18mg用2.0ml, pH7.0, 0.1mol/L磷酸盐缓冲液溶解,得到II液;

3) 取EDC10mg用0.5ml, pH7.0, 0.1mol/L磷酸盐缓冲液溶解,得到III液;

4) 将I液与II液混合,在搅拌下缓慢滴加入III液,室混反应2小时,4℃透析二天,每天换液三次,得到包被原。

[0023] 3、烯酰吗啉单克隆抗体的制备

a. 动物免疫

将上述步骤得到的免疫抗原注入到Balb/c小鼠体内,免疫剂最为150ug/只,使其产生抗血清。

[0024] b. 细胞融合和克隆化

取免疫Bal b/c小鼠脾细胞,按9:1(数最配比)比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合筛选得到稳定分泌烯酰吗啉单克隆抗体的烯酰吗啉单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0025] c. 细胞冻存和复苏

将杂交瘤细胞用冻存液制成 1×10^9 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。

[0026] d. 单克隆抗体的制备与纯化

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,用辛酸一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。

[0027] 4、酶标板的制备

用包被缓冲液将包被原稀释成0.1~0.2ug/ml,每孔加入100 μ l,37℃温育2h或4℃过夜,倾去包被液,用洗涤液洗涤2次,每次30s,拍干,然后在每孔中加入150~200 μ l封闭液,37℃温育1~2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0028] 5、酶标记抗体的制备

将抗体与辣根过氧化物酶(HRP)采用过碘酸钠法进行偶联制备酶标记抗体,酶与抗体的摩尔浓度比为2:1。

[0029] 实施例2 检测烯酰吗啉的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测烯酰吗啉的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

- (1) 包被烯酰吗啉偶联抗原的酶标板;
- (2) 烯酰吗啉标准品溶液6瓶,浓度分别为0ug/L、1ug/L、3ug/L、9ug/L、27ug/L、81ug/L。

[0030] (3) 浓缩酶结合物;

(4) 酶结合物稀释液;

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

(6) 终止液为2mol/L硫酸。

[0031] 实施例3样品中烯酰吗啉的检测

1. 样品前处理

用均质器均质蔬菜样本;称取 $5.0\text{g} \pm 0.05\text{g}$ 均质后的蔬菜样小至50ml聚苯乙烯离心管中,加入25ml 50%甲醇,用振荡器剧烈振荡5min,3000r以上,室温(20-25°C/68-77°F)离心5min;取500 μl 上清液至2ml聚苯乙烯离心管中,加入500 μl 10%氯化钠水溶液用振荡器振荡1min,混匀;取20 μl 用于分析。

[0032] 2. 用试剂盒检测

向包被有烯酰吗啉偶联抗原的酶标板微孔中加入赭曲霉毒素A标准品溶液/样品20 μl ,再加入酶结合物工作液100 μl (将浓缩酶结合物用酶结合物稀释液按照1:20的体积进行稀释),用盖板膜封板,25°C避光反应10min,倒出孔内液体,每孔加入250 μl 去离子水充分洗涤4-5次,每次间隔10s,用吸水纸拍干,每孔加入底物液A液过氧化脲50 μl ,底物液B液四甲基联苯胺(TMB)50 μl ,轻轻振荡混匀,25.°C恒温箱避光显色5min,每孔加入2mol/L终止液硫酸50 μl ,轻轻振荡混匀,用酶标仪波长设定在450nm处,测定每孔吸光度值(OD值)。

[0033] 3. 检测结果分析

用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准品溶液(0标准)的吸光度值(B_0)再乘以100%,得到百分吸光度值。以烯酰吗啉标准品浓度(ug/L)的对数值为X轴,百分吸光度值为Y轴,绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值,相对应每一个样品的浓度,则可从标准曲线上读出烯酰吗啉的含量。

[0034] 实施例4 烯酰吗啉酶联免疫试剂盒灵敏度、精密度和准确度、保存期实验

1. 试剂盒灵敏度和剑检测限

按照常规方法测定试剂盒灵敏度试验,试剂盒灵敏度为1ug/L,分别对20份空白蔬菜(原料、配合料、浓缩料)样本进行检测,从标准曲线上查出对应于各百分吸光率的浓度,以20份样本烯酰吗啉浓度的平均值加上3倍标准差表示检测限,结果得该方法对蔬菜(原料、配合料、浓缩料)样本检测限为10 ug/kg。

[0035] 2. 试剂盒准确度和精密度

以重复测定某一浓度样品的检测结果变异系数(CV%)作为精密度评价指标。以回收率作为准确度评价指标。变异系数CV%计算公式为: $CV\% = \frac{SD}{X} \times 100\%$;其中SD为标准偏差,X为测定数据的平均值。回收率计算公式为:回收率(%)=实际测定值/理论值 $\times 100\%$ 。其中理论值为模拟样品的添加浓度。

[0036] 按10ug/kg、20ug/kg、40 ug/kg三个浓度烯酰吗啉对几种蔬菜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。

样品名称	添加浓度	回收率	批内变异系数	批间变异系数
蔬菜 1	10	88.5	10.5	10.6
	20	98.7	7.8	8.8
	40	95.6	6.4	7.5
蔬菜 2	10	91.4	9.8	10.3
	20	96.0	11.3	11.6
	40	102.8	10.5	11.5
蔬菜 3	10	87.8	7.5	8.0
	20	95.6	11.3	11.6
	40	94.2	8.2	8.7

[0037] 表I 精密度及准确度试验

以10、20、40ug/kg三个浓度的烯酰吗啉对蔬菜样品进行添加,平均回收率在87.8%~102.8%之间;变异系数均小于20%。检测结果的精密度和准确度均符合相关标准要求。

[0038] 3. 试剂盒保存期试验

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、烯酰吗啉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在2~8℃可以保存12个月。

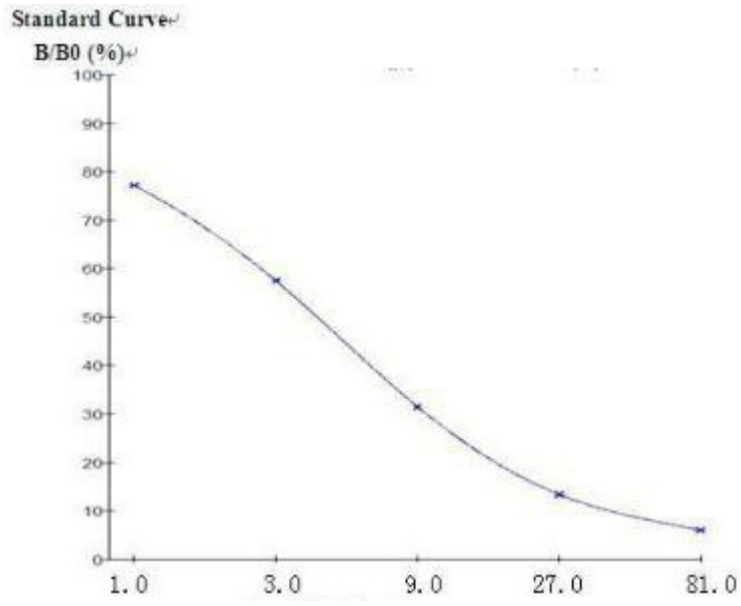


图1

专利名称(译)	检测烯酰吗啉的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN108205060A	公开(公告)日	2018-06-26
申请号	CN201611164047.7	申请日	2016-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	镇江亿特生物科技发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	镇江亿特生物科技发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	镇江亿特生物科技发展有限公司		
[标]发明人	洪霞 刘静 立雯馨		
发明人	洪霞 刘静 立雯馨		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N33/543 G01N21/31 G01N21/78 G01N1/34 G01N1/38		
CPC分类号	G01N33/558 G01N1/34 G01N1/38 G01N21/31 G01N21/78 G01N33/531 G01N33/54306 G01N2021/3185		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测烯酰吗啉的酶联免疫试剂盒，它含有：包被有烯酰吗啉偶联抗原的酶标板，烯酰吗啉标准品溶液，浓缩酶结合物，酶结合物工作液，底物显色液，终止液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测样本中烯酰吗啉的方法，它包括：首先进行样本前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测蔬菜(原料、配合料和浓缩料)样本中烯酰吗啉的残留量，其操作简便、成本低、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。

Standard Curve

