



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109061153 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201811104585.6

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2018.09.21

G01N 21/64(2006.01)

(71)申请人 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

申请人 国家烟草质量监督检验中心

(72)发明人 陈黎 范子彦 刘惠民 唐纲岭

崔华鹏 樊美娟 赵乐 王晓瑜

秦亚琼 王洪波

(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)

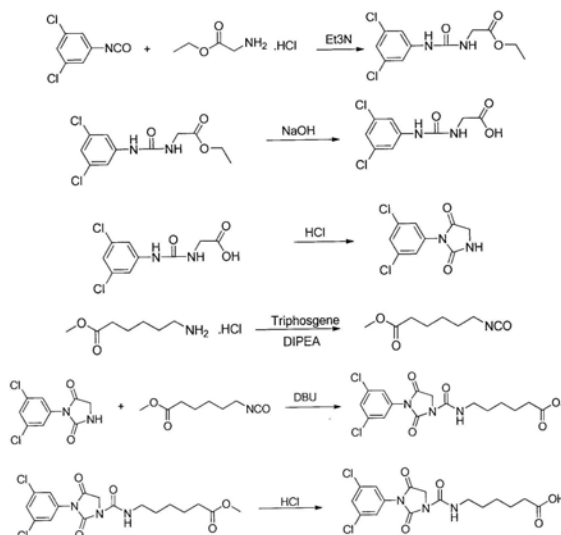
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

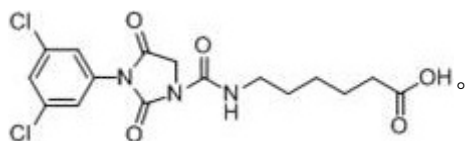
一种检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用

(57)摘要

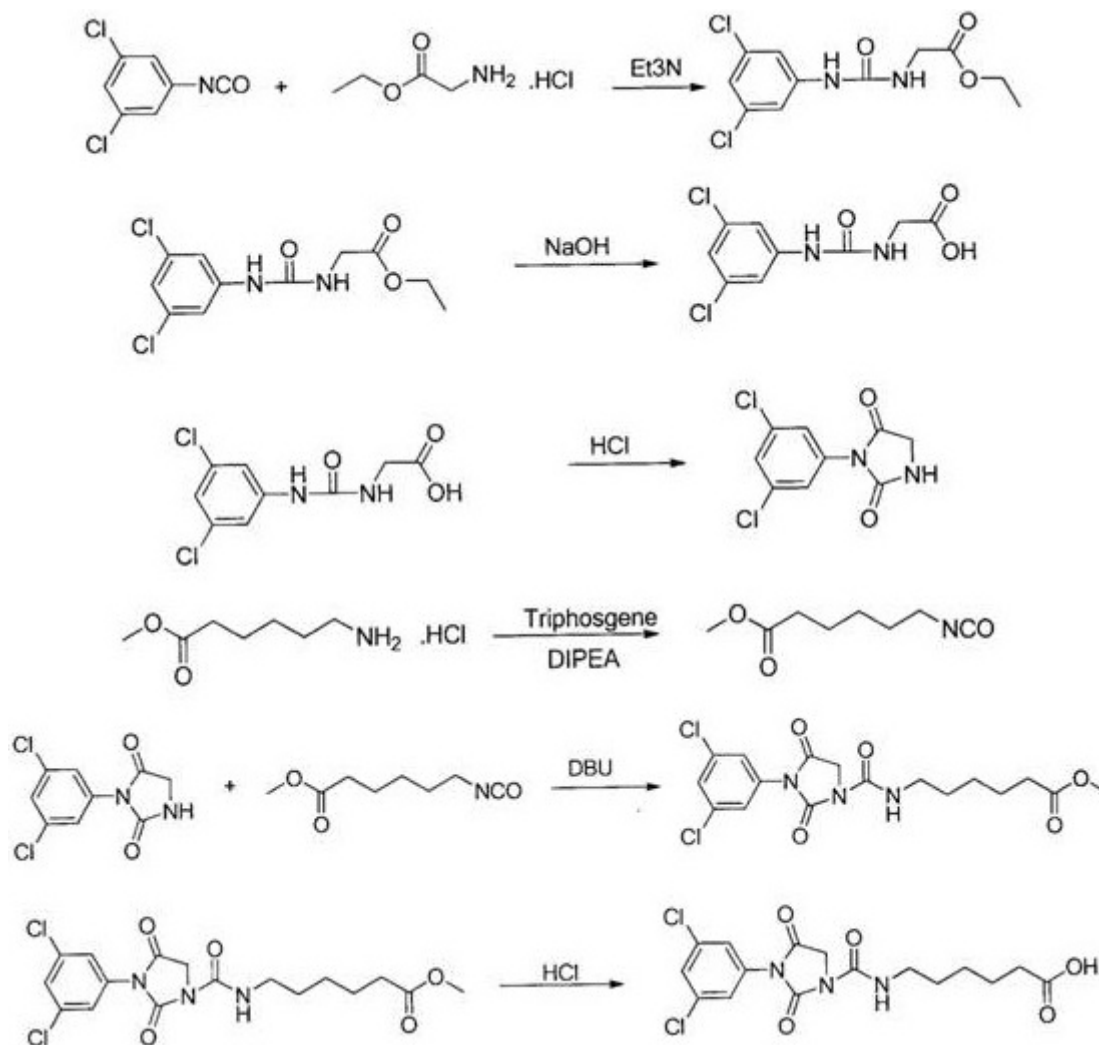
本发明公开了一种检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用。该试纸条包括底板及在底板上依次搭接粘贴的样品吸收垫、结合物释放垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，结合物释放垫上包埋有荧光微球标记的异菌脲单克隆抗体，硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区，检测区喷涂有异菌脲半抗原-载体蛋白偶联物，质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体，异菌脲半抗原是由3,5-二氯苯异氰酸酯与甘氨酸乙酯盐酸盐、6-氨基己酸甲酯盐酸盐等经过一系列反应得到。本发明提供的试纸条和检测方法具有操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低的优点，能实现对大批量样品中异菌脲的快速检测。



1. 一种检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条, 包括底板及在底板上依次搭接粘贴的样品吸收垫、结合物释放垫、硝酸纤维素膜和吸水垫, 其特征在于所述结合物释放垫上包埋有荧光微球标记的异菌脲单克隆抗体, 所述硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区, 所述检测区喷涂有异菌脲半抗原-载体蛋白偶联物, 所述质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体; 所述异菌脲单克隆抗体是以异菌脲半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得; 所述异菌脲半抗原-载体蛋白偶联物是由异菌脲半抗原与载体蛋白偶联得到, 所述异菌脲半抗原是由 3,5-二氯苯异氰酸酯与甘氨酸乙酯盐酸盐反应生成 2-(3-(1,5-二氯苯基脲基)) 乙酸乙酯, 水解得到 2-(3-(1,5-二氯苯基脲基)) 乙酸, 再经过成环反应, 得到 3-(3,5-二氯苯基)-2,4-咪唑烷基二酮, 再与 6-氨基己酸甲酯盐酸盐与三光气反应得到的 6-异氰酸基己酸甲酯反应生成 6-(3-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧咪唑烷基-1-甲酰胺基) 己酸甲酯, 最后在酸性条件下水解得到, 其分子结构式为:



2. 如权利要求1所述的检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条, 其特征在于: 所述异菌脲半抗原的制备反应过程如下:



3. 根据权利要求1所述的检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于:所述荧光微球是直径为100~300nm的用聚苯乙烯包裹荧光物质的微球,其表面连接有一COOH基团。

4. 根据权利要求3所述的检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于:所述荧光物质为镧系。

5. 根据权利要求1所述的检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于: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。

6. 一种权利要求1-5任一所述的检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 结合物释放垫的制备:用荧光微球标记异菌脲单克隆抗体,并将其以特定缓冲体系稀释后,将结合物释放垫浸泡于稀释缓冲液中,经真空冷冻干燥后制备;

2) 硝酸纤维素膜的制备:将异菌脲半抗原-载体蛋白偶联物喷涂到硝酸纤维素膜上的检测区范围,制成检测区;将羊抗鼠抗抗体喷涂到硝酸纤维素膜上的质控区范围,制成质控区;

3) 组装和剪切:在底板上依次搭接地粘贴样品吸收垫、包埋有荧光微球标记异菌脲单克隆抗体的结合物释放垫、固定有检测区和质控区的硝酸纤维素膜及吸水垫,并剪切成所需的宽度即为时间分辨荧光免疫层析试纸条。

7. 一种权利要求1-5任一所述的检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条的应用,其特征在于包括以下步骤:

1) 样品前处理;

2) 用所述试纸条进行检测;

3) 用荧光检测仪分析检测结果。

一种检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于农药残留检测领域,具体涉及一种检测烟草及烟草制品中异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 异菌脲(Iprodione)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。我国针对不同作物,制定了异菌脲的最大残留限量标准,其中在油菜籽、黄瓜中的最大残留限量为2 mg/kg,在番茄、苹果、梨中的最大残留限量为5 mg/kg,在葡萄、香蕉中的最大残留限量为10 mg/kg。国际烟草科学研究合作中心(CORESTA)规定烟草中异菌脲的指导性残留限量为0.5 mg/kg,我国尚未制定异菌脲的最大残留限量,在实际生产中,以0.5 mg/kg作为烟草最大残留量判定标准。

[0003] 目前,常用检测方法有高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、气相色谱法、气相色谱-质谱联用法等。由于以上方法均需先进检测仪器、检测费用昂贵、步骤繁琐、耗时,且对操作人员专业性要求较高,不适用于基层企事业单位的高通量快速筛查检测。因此,开发一种不受检测设备限制、能实现大批量样品快速检测的产品和方法正是本发明要解决的问题。

[0004] 荧光免疫层析技术是在荧光染料标记技术上发展起来的,作为一种免疫学检测方法,它是免疫亲和技术、免疫标记技术、免疫层析技术的结合,具有快速、操作简便等优点。相比传统标记物,荧光微球的发光强度可以随激发光的强度增强而增强,所以荧光微球标记有望提高免疫层析技术的检测限;而在微球壳结构的作用下,荧光微球具有相对稳定的形态结构,粒度均一、单分散性好、稳定性好、发光效率高、重复性好,有较好的生物相容性;形成微球后染料荧光猝灭大大减少,发射强而稳定,且基本不受外界环境介质变化的影响。因此相比上述检测方法,荧光微球免疫层析技术同时具有检测灵敏度高、操作简便、稳定性好的优点。目前尚无用于检测烟草及烟草制品中异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条。

发明内容

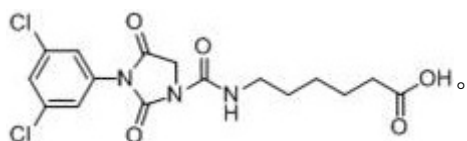
[0005] 本发明的一个目的是针对上述现有技术的缺陷,提供一种灵敏度高、操作简便、检测快速、价格低廉的检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条;本发明的另一个目的是提供上述试纸条的制备方法;本发明的再一个目的是提供上述试纸条在检测异菌脲中的应用。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采取的一个技术方案是:

提供一种检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条,它包括底板及在底板上依次搭

接粘贴的样品吸收垫、结合物释放垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述结合物释放垫上包埋有荧光微球标记的异菌脲单克隆抗体,所述硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区,所述检测区喷涂有异菌脲半抗原-载体蛋白偶联物,所述质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体。

[0007] 所述异菌脲单克隆抗体是以异菌脲半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得;所述异菌脲半抗原-载体蛋白偶联物是由异菌脲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、兔血清蛋白或人血清白蛋白,所述异菌脲半抗原是由3,5-二氯苯异氰酸酯与甘氨酸乙酯盐酸盐反应生成2-(3-(1,5-二氯苯基脲基))乙酸乙酯,水解得到2-(3-(1,5-二氯苯基脲基))乙酸,再经过成环反应,得到3-(3,5-二氯苯基)-2,4-咪唑烷基二酮,再与6-氨基己酸甲酯盐酸盐与三光气反应得到的6-异氰酸基己酸甲酯反应生成6-(3-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧咪唑烷基-1-甲酰胺基)己酸甲酯,最后在酸性条件下水解得到,其分子结构式为:



[0008] 所述异菌脲半抗原的制备具体包括以下步骤:

1)取8.37 g(60 mmol)甘氨酸乙酯盐酸盐及16.5 mL(120 mmol)三乙胺加入100 mL二氯甲烷中,0℃下滴加10 g(53 mmol)3,5-二氯苯异氰酸酯的二氯甲烷溶液,室温搅拌过夜,过滤去不溶固体,滤液分别用2 N盐酸,饱和碳酸氢钠溶液,饱和食盐水洗涤,有机层用无水硫酸镁干燥,蒸去溶剂后得到白色固体2-(3-(1,5-二氯苯基脲基))乙酸乙酯。

[0009] 2)将上述白色固体加入150 mL 6%氢氧化钠水溶液中,搅拌下加热至90℃反应3 h,冷却至室温,150 mL乙酸乙酯萃取出少量未反应原料及副产物,水相在0℃下用4 N盐酸调pH值至2,过滤得到白色固体2-(3-(1,5-二氯苯基脲基))乙酸。

[0010] 3)将上述白色固体加入100 mL 20%盐酸中,搅拌加热回流(105-115℃)4 h,冷却至室温,过滤得到白色固体,水洗干燥得到9.50 g白色固体3-(3,5-二氯苯基)-2,4-咪唑烷基二酮。

[0011] 4)反应瓶中,将2.20 g(7.36 mmol)三光气溶于30 mL二氯甲烷中。0℃下,将3.34 g(18.4 mmol)6-氨基己酸甲酯盐酸盐及7.13 g(55.2 mmol)二异丙基乙基胺(DIEPA)的二氯甲烷溶液缓慢滴入上述反应液中,室温搅拌反应1 h,蒸去二氯甲烷,残余固体中加入50 mL无水乙醚搅拌,滤去不溶的盐,滤液浓缩得到6-异氰酸基己酸甲酯2.30 g。

[0012] 5)将3.00 g(12.2 mmol)3-(3,5-二氯苯基)-2,4-咪唑烷基二酮及2.67 g(18.4 mmol)DBU(1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一碳烯)加入50 mL二氯甲烷中,0℃下,缓慢滴加2.30 g(13.5 mmol)6-异氰酸基己酸甲酯的二氯甲烷溶液,室温搅拌反应4 h,反应液蒸去溶剂,残余物经硅胶柱层析纯化,用体积比为1:5的乙酸乙酯/石油醚洗脱,得到6-(3-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧咪唑烷基-1-甲酰胺基)己酸甲酯1.83 g。

[0013] 6)将1.83 g(4.4 mmol)6-(3-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧咪唑烷基-1-甲酰胺基)己酸甲酯溶于50 mL四氢呋喃中,加入1 mL 20%盐酸,50℃下反应4 h,室温反应过夜。反应液蒸去溶剂,残余物经硅胶柱层析纯化,用体积比为30:1的二氯甲烷/甲醇洗脱,得到异菌脲半抗原6-(3-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧咪唑烷基-1-甲酰胺基)己酸1.12 g。

[0014] 所述荧光微球是直径为100~300nm的用聚苯乙烯包裹荧光物质的微球,其表面连

接有一COOH基团,所述荧光物质为镧系。

[0015] 本发明采取的另一个技术方案是提供一种制备上述检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条的方法,它包括如下步骤:

1) 结合物释放垫的制备:用市售的荧光微球标记异菌脲单克隆抗体,并将其以特定缓冲体系稀释后,将结合物释放垫浸泡于稀释缓冲液中,经真空冷冻干燥后制备;

2) 硝酸纤维素膜的制备:将异菌脲半抗原-载体蛋白偶联物喷涂到硝酸纤维素膜上的检测区范围,制成检测区;将羊抗鼠抗抗体喷涂到硝酸纤维素膜上的质控区范围,制成质控区;

3) 组装和剪切:在底板上依次搭接地粘贴样品吸收垫、包埋有荧光微球标记异菌脲单克隆抗体的结合物释放垫、固定有检测区和质控区的硝酸纤维素膜及吸水垫,并剪切成所需的宽度即为时间分辨荧光免疫层析试纸条。

[0016] 具体地说,步骤包括:

1) 3,5-二氯苯异氰酸酯与甘氨酸乙酯盐酸盐反应生成2-(3-(1,5-二氯苯基脲基))乙酸乙酯,水解得到2-(3-(1,5-二氯苯基脲基))乙酸,再经过成环反应,得到3-(3,5-二氯苯基)-2,4-咪唑烷基二酮,再与6-氨基己酸甲酯盐酸盐与三光气反应得到的6-异氰酸基己酸甲酯反应生成6-(3-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧咪唑烷基-1-甲酰胺基)己酸甲酯,最后在酸性条件下水解得到异菌脲半抗原;

2) 将异菌脲半抗原与载体蛋白偶联,制备异菌脲半抗原-载体蛋白偶联物;

3) 用异菌脲半抗原-载体蛋白偶联物免疫小鼠,将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到分泌异菌脲单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

4) 提取小鼠IgG免疫健康山羊,得到羊抗鼠抗抗体;

5) 分别将异菌脲半抗原-载体蛋白偶联物和羊抗鼠抗抗体喷涂到硝酸纤维素膜的检测区范围(T)和质控区范围(C);

6) 将样品吸收垫用含0.5%牛血清白蛋白(体积分数)、pH为7.2、0.1 mol/L磷酸盐缓冲液浸泡2 h,37℃下烘干2 h;

7) 用市售的荧光微球标记异菌脲单克隆抗体,并将其以特定缓冲体系稀释后,将结合物释放垫浸泡于稀释缓冲液中,经真空冷冻干燥后备用;

8) 在底板上依次搭接地粘贴样品吸收垫、包埋有荧光微球标记异菌脲单克隆抗体的结合物释放垫、固定有检测区和质控区的硝酸纤维素膜及吸水垫,并剪切成所需的宽度即为时间分辨荧光免疫层析试纸条。

[0017] 本发明采取的另一个技术方案是提供一种上述检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条在检测异菌脲中的应用,它包括如下步骤:

1) 样品前处理;

2) 用所述的检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条进行检测;

3) 用荧光检测仪分析检测结果。

[0018] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

(1) 特异性强、灵敏度高:本试纸条采用将荧光微球标记的异菌脲单克隆抗体包埋在结合物释放垫上,具有亲水性佳、可大容量吸附抗体偶联物、迅速重湿润、抗体结合物释放充分、性能好、释放快、形态好等优势,从而减少误差,降低成本,增加整个体系的反应灵敏度。

[0019] (2)时间分辨荧光具有较大stock位移,减少了由激发光引起的特异杂散光对检测的干扰,提高荧光检测稳定性;其寿命长,消除了环境中荧光物质对待测物的干扰;其激发波长较宽,发射光谱范围较窄,降低了本底荧光强度,提高了分辨率。

[0020] (3)荧光微球表面包裹了聚苯乙烯,实现了对荧光物质螯系的保护,减少了外界环境的干扰,增加了荧光微球的稳定性及荧光寿命。

[0021] (4)荧光微球表面修饰活性基团—COOH,采用化学偶联的方法来标记抗体,形成抗体与微球的稳定结合。

[0022] 目前尚无用于检测烟草及烟草制品中异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条,本发明填补了该空白。本发明的试纸条具有成本低、操作简单、检测时间短、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异菌脲的方法,简便、快速、直观、准确、无需大型仪器、成本低、易推广使用。

附图说明

[0023] 图1为时间分辨荧光免疫层析试纸条剖面结构示意图;

图2为异菌脲半抗原合成路线图(该图作为摘要附图)。

具体实施方式

[0024] 下面结合实施例及附图对本发明做进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0025] 实施例1 检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条的构成

一、试纸条

参见图1:所述试纸条是由底板、样品吸收垫、结合物释放垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成;

所述样品吸收垫1、结合物释放垫2、硝酸纤维素膜3和吸水垫4依次按顺序搭接粘贴在底板7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硝酸纤维素膜的始端连接,硝酸纤维素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;

所述硝酸纤维素膜上固定有检测区5和质控区6,检测区喷涂有异菌脲半抗原-载体蛋白偶联物(异菌脲半抗原-卵清蛋白偶联物),质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体;

所述底板为PVC底板;所述结合物释放垫为玻璃棉;所述吸水垫为吸水纸。

[0026] 实施例2 检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备

检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备方法主要包括以下步骤:

1) 结合物释放垫的制备:用市售的荧光微球标记异菌脲单克隆抗体,并将其以特定缓冲体系稀释后,将结合物释放垫浸泡于稀释缓冲液中,经真空冷冻干燥后制备;

2) 硝酸纤维素膜的制备:将异菌脲半抗原-载体蛋白偶联物喷涂到硝酸纤维素膜上的检测区范围,制成检测区;将羊抗鼠抗抗体喷涂到硝酸纤维素膜上的质控区范围,制成质控区;

3) 组装和剪切:在底板上依次搭接地粘贴样品吸收垫、包埋有荧光微球标记异菌脲单克隆抗体的结合物释放垫、固定有检测区和质控区的硝酸纤维素膜及吸水垫,并剪切成所需的宽度即为时间分辨荧光免疫层析试纸条。

[0027] 下面分步详细叙述:

(一) 各部件的制备

1、异菌脲半抗原-载体蛋白偶联物的合成与鉴定

异菌脲是小分子物质,只有免疫反应性,没有免疫原性,不能诱发机体产生免疫应答,必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。

[0028] (1) 异菌脲半抗原的制备

1) 取8.37 g (60 mmol) 甘氨酸乙酯盐酸盐及16.5 mL (120 mmol) 三乙胺加入100 mL 二氯甲烷中,0℃下滴加10 g (53 mmol) 3,5-二氯苯异氰酸酯的二氯甲烷溶液,室温搅拌过夜,过滤去不溶固体,滤液分别用2 N盐酸,饱和碳酸氢钠溶液,饱和食盐水洗涤,有机层用无水硫酸镁干燥,蒸去溶剂后得到白色固体2-(3-(1,5-二氯苯基脲基))乙酸乙酯。

[0029] 2) 将上述白色固体加入150 mL 6%氢氧化钠水溶液中,搅拌下加热至90℃反应3 h,冷却至室温,乙酸乙酯萃取出少量未反应原料及副产物,水相在0℃下用4 N盐酸调pH值至2,过滤得到白色固体2-(3-(1,5-二氯苯基脲基))乙酸。

[0030] 3) 将上述白色固体加入100 mL 20%盐酸中,搅拌加热回流4 h,冷却至室温,过滤得到白色固体,水洗干燥得到9.50 g白色固体3-(3,5-二氯苯基)-2,4-咪唑烷基二酮,三步总收率73.2%。

[0031] 4) 反应瓶中,将2.20 g (7.36 mmol) 三光气溶于30 mL 二氯甲烷中。0℃下,将3.34 g (18.4 mmol) 6-氨基己酸甲酯盐酸盐及7.13 g (55.2 mmol) 二异丙基乙基胺(DIEPA)的二氯甲烷溶液缓慢滴入上述反应液中,室温搅拌反应1 h,蒸去二氯甲烷,残余固体中加入50 mL 无水乙醚搅拌,滤去不溶的盐,滤液浓缩得到6-异氰酸基己酸甲酯2.30 g。

[0032] 5) 将3.00 g (12.2 mmol) 3-(3,5-二氯苯基)-2,4-咪唑烷基二酮及2.67 g (18.4 mmol) DBU(1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一碳烯)加入50 mL 二氯甲烷中,0℃下,缓慢滴加2.30 g (13.5 mmol) 6-异氰酸基己酸甲酯的二氯甲烷溶液,室温搅拌反应4 h,反应液蒸去溶剂,残余物经硅胶柱层析纯化,用体积比为1:5的乙酸乙酯/石油醚洗脱,得到6-(3-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧咪唑烷基-1-甲酰胺基)己酸甲酯1.83 g,收率36.1%。

[0033] 6) 将1.83 g (4.4 mmol) 6-(3-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧咪唑烷基-1-甲酰胺基)己酸甲酯溶于50 mL 四氢呋喃中,加入1 mL 20%盐酸,50℃下反应4 h,室温反应过夜。反应液蒸去溶剂,残余物经硅胶柱层析纯化,用体积比为30:1的二氯甲烷/甲醇洗脱,得到异菌脲半抗原6-(3-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧咪唑烷基-1-甲酰胺基)己酸1.12 g,收率63.3%。

[0034] 核磁鉴定¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 12.04 (1H, s), 10.07 (1H, s, NH), 7.73 (2H, d, J = 1.80 Hz), 7.34 (1H, t, J = 1.80 Hz), 4.32 (2H, s), 3.44 (2H, t, J = 6.81 Hz), 2.20 (2H, t, J = 6.25 Hz), 1.62-1.44 (4H, m), 1.36-1.22 (2H, m)。图谱中,化学位移δ=12.04为间隔臂上羧基氢的共振吸收峰,δ=3.44、2.20、1.62-1.44、1.36-1.22为间隔臂上亚甲基氢的共振吸收峰,这些峰的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。

[0035] (2) 免疫原的制备

异菌脲半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

[0036] 取9.0 mg 异菌脲半抗原,溶解于1.0 mL 二甲基甲酰胺(DMF)中,加氯甲酸异丁酯0.18 mL,加吡啶0.3 mL,室温搅拌5 h,得到半抗原活化液A液;取50 mg 牛血清白蛋白

(BSA),充分溶解在3.8 mL磷酸盐缓冲液PBS中,得到B液,将A液滴加到B液中,室温搅拌5 h,用0.01 mol/L PBS在4℃透析3天,以除去未反应的小分子物质,得到异菌脲-BSA免疫原;于-20℃保存备用。

[0037] (3) 包被原的制备

异菌脲半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0038] 取7.0 mg异菌脲半抗原,溶解于1.0 mL DMF中,加氯化亚砷0.27 mL,60℃反应6 h,停止反应冷却到室温,得到半抗原活化液A液;取50 mg卵清白蛋白(OVA),充分溶解在3.8 mL PBS中,得到B液,将A液滴加到B液中,室温反应8 h,停止反应,用0.01 mol/L的PBS缓冲液透析纯化3天,每天换液3次,分装,得到异菌脲-OVA包被原,-20℃保存备用。

[0039] (4) 鉴定

确定偶联是否成功:一般通过紫外扫描法鉴定半抗原与载体蛋白的偶联是否为有效偶联,因为半抗原与蛋白在紫外下有不同的特征吸收,当偶联成功时,偶联物的紫外吸收会有二者的迭加效应出现,因此比着单独的蛋白特征吸收会发生一定的偏移,可用于检测偶联是否成功。

[0040] 偶联比的测定:用纯水稀释异菌脲半抗原、牛血清白蛋白、卵清蛋白和两种蛋白与异菌脲半抗原的结合物,配制成一定浓度的溶液,然后用紫外分光光度计进行全波长扫描,得到它们的紫外吸收光谱图。

[0041] 根据公式 $K=A/CL$ 分别计算出异菌脲半抗原、牛血清白蛋白、卵清蛋白的摩尔消光系数。在载体蛋白和异菌脲半抗原的最大波长处检测偶联物的光吸收值,按公式计算两种物质在偶联物中的摩尔浓度比,即偶联比:

$$C_a/C_b = (A_{偶260} \times K_{BSA280} - A_{偶280} \times K_{BSA260}) / (A_{偶280} \times K_{异菌脲260} - A_{偶260} \times K_{异菌脲280})$$

蛋白含量的测定:将偶联物稀释到适当倍数后,测定280 nm和260 nm的分光光度值,按公式计算蛋白的浓度即偶联物的浓度:

$$\text{蛋白质 (mg/mL)} = 1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}$$

免疫原和包被原的鉴定结果:通过紫外扫描法鉴定半抗原与载体蛋白的偶联是有效偶联,根据异菌脲半抗原、载体蛋白、偶联物在特定波长的摩尔吸光系数估算半抗原与载体蛋白的结合比分别为15:1和11:1,偶联效果较好,免疫原的蛋白含量为15.1 mg/mL,包被原的蛋白含量为6.9 mg/mL。

[0042] 2、异菌脲单克隆抗体的制备

(1) 杂交瘤细胞的获得

1) 首次免疫:将异菌脲半抗原-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,免疫剂量为150 μg/只;

2) 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;

3) 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;

4) 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异菌脲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。

[0043] (2) 单克隆抗体的制备

1) 细胞复苏:取出异菌脲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;

2) 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,得到异菌脲单克隆抗体溶液(-20℃保存)。

[0044] (3) 单克隆抗体效价的测定

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

[0045] 间接竞争ELISA方法:用异菌脲半抗原-OVA偶联物包被酶标板,加入异菌脲标准品溶液、异菌脲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。

[0046] (4) 单克隆抗体特异性的测定

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。

[0047] 本实验将异菌脲及与其他二甲酰亚胺类杀菌剂(腐霉利、菌核净、乙烯菌核利)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:

交叉反应率 (%) =	引起 50%抑制的异菌脲浓度	×100%
	引起 50%抑制的其他二甲酰亚胺类杀菌剂浓度	

结果显示异菌脲及其结构类似物的交叉反应率为:异菌脲100%、腐霉利<1%、菌核净<1%、乙烯菌核利<1%。本发明抗体对腐霉利、菌核净、乙烯菌核利等其他二甲酰亚胺类杀菌剂无交叉反应,只针对异菌脲有特异性结合。

[0048] 3、羊抗鼠抗抗体的制备

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。

[0049] 4、荧光微球标记异菌脲单克隆抗体的制备

(1) 活化:取市售的内部包埋荧光染料、表面修饰有羧基官能团的微球悬液100 μL混悬于900 μL活化缓冲液中,于4℃ 10000 r/min离心10min后弃上清,重悬微球于1 mL活化缓冲液中,以此法洗涤微球2次,加入适量活化剂,混匀后室温振荡活化10 min;

(2) 偶联:将(1)所述混悬液于4℃ 10000 r/min离心10min后弃上清,重悬于偶联缓冲液中,以此法洗涤微球2次,加入10~20 μL异菌脲单克隆抗体溶液(蛋白浓度1 mg/mL),混匀后室温震荡偶联120 min;

(3) 封闭:将(2)所述混悬液于4℃ 10000 r/min离心10 min后弃上清,重悬于封闭缓冲液中,以此法洗涤微球1次,混匀后室温震荡封闭30 min;

(4) 贮存:将(3)所述混悬液于4℃ 10000 r/min离心10 min后弃上清,重悬于贮存缓冲液中,以此法洗涤微球1次,混匀后于4℃避光保存。

[0050] 所述活化缓冲液为pH值为5.5~6.5、0.05 mol/L的2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲

液。

[0051] 所述活化剂为水溶性碳二亚胺,其中摩尔质量比EDC:NHS:COOH = (1.5~3):(8~20):1,临用前用活化缓冲液稀释至所需浓度。

[0052] 所述偶联缓冲液为pH值为7.5~8.5 0.05 mol/L的硼酸盐缓冲液(避免使用存在游离胺的溶剂)。

[0053] 所述封闭缓冲液为含0.1~0.4 mol/L伯胺(盐酸羟胺、乙醇胺或氨基乙醇)、1%~10% BSA的pH值为7.4的PB缓冲液。

[0054] 所述贮存缓冲液为含0.01% NaN₃、0.1% BSA的pH值为7.4的PB缓冲液。

[0055] 5、结合物释放垫的制备

将贮存的荧光微球标记的异菌脲单克隆抗体以贮存缓冲液稀释后,将结合物释放垫浸泡于稀释缓冲液中,经真空冷冻干燥后备用。

[0056] 6、硝酸纤维素(NC)膜的制备

用0.05 mol/L、pH值为7.2的PBS缓冲液将异菌脲半抗原-卵清蛋白偶联物稀释到100 μg/mL,用Isoflow点膜仪将其喷涂于NC膜上的检测区(T),喷膜量为1.0 μL/cm;用0.01 mol/L、pH值为7.4的PBS缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释到200 μg/mL,用Isoflow点膜仪将其喷涂于NC膜上的质控区(C),喷膜量为1.0 μL/cm。将制备好的NC膜置于37℃条件下干燥2 h,备用。

[0057] 7、样品吸收垫的制备

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

[0058] (二)试纸条的组装

将样品吸收垫、结合物释放垫、硝酸纤维素膜、吸水垫从左至右依次搭接粘贴固定在底板上,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硝酸纤维素膜的始端相连,硝酸纤维素膜的末端与吸水垫的始端相连,样品吸收垫的始端与底板的始端对齐,吸水垫的末端与底板的末端对齐,然后用机器切成3.96 mm宽的小条,装在特制的塑料制卡中,形成试纸卡。异菌脲荧光微球免疫层析试纸卡在2~8℃阴凉避光干燥保存,有效期为12个月。

[0059] 实施例3 检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条的应用

1、烟叶样品前处理

称取1.0±0.05 g粉碎后的待测样品至50 mL离心管中,加入10 mL 50%甲醇水溶液,涡旋1 min,3000 rpm以上离心5 min;取100 μL上清液,加入400 μL样本复溶液,混匀待测。

[0060] 2、用试纸条检测

吸取100 μL待检样本溶液垂直滴加于试纸卡加样孔中,液体流动时开始计时,反应10 min;将试纸卡插入KFT-100A型荧光检测仪的承载器中,通过触摸显示屏选择待检项目,按下“开始检测”按键,荧光检测仪将自动对试纸卡进行扫描测试,通过仪器的显示屏幕上读取或打印检测结果。

[0061] 3、检测结果分析

(1)定量检测

测试完成后,仪器获得荧光试纸条上检测区时间分辨荧光强度与质控区时间分辨荧光强度的比值,基于预先内置的荧光试纸条上检测区时间分辨荧光强度与质控区时间分辨荧

光强度的比值与异菌脲浓度的关系曲线,获得待测样品提取液中异菌脲的含量,最后经换算即得待测样品中异菌脲的含量。

[0062] (2) 半定量检测

测试完成后,仪器将根据检测得到的检测区时间分辨荧光强度与质控区时间分辨荧光强度的比值,自动计算出提取液中异菌脲的浓度值,并根据预设的阈值给出阴阳性判断。

[0063] 阴性(-):若荧光检测仪的显示屏幕上结果显示为阴性,表示样本中不含有异菌脲或其浓度低于检测限。

[0064] 阳性(+):若荧光检测仪的显示屏幕上结果显示为阳性,表示样本中异菌脲浓度等于或高于检测限。

[0065] 无效:若质控区未检出荧光信号强度,表明不正确的操作过程或试纸卡已失效。

[0066] 实施例4 样品检测实例

1、检测限试验

向空白烟草样品中分别添加异菌脲标准品至终浓度为0.2、0.4、0.8 mg/kg,用时间分辨荧光免疫层析试纸条进行检测,结果为:异菌脲浓度为0.2 mg/kg时,荧光检测仪检测为阴性;异菌脲浓度为0.4、0.8 mg/kg时,荧光检测仪检测为阳性,表明本试纸条对烟草中异菌脲的检测限为0.4 mg/kg。

[0067] 2、假阳性率、假阴性率试验

取已知异菌脲含量大于0.4 mg/kg的阳性烟叶样本20份,已知不含异菌脲的阴性烟叶样本20份,用3个批次生产的时间分辨荧光免疫层析试纸条分别进行检测,计算其阴阳性率。结果见表2。

[0068] 表2 检测阳性、阴性样本结果

浓度 批次	阳性烟叶样本 (20份)	阴性烟叶样本 (20份)
1	20份阳性	20份阴性
2	20份阳性	20份阴性
3	20份阳性	20份阴性

结果表明:用3个批次生产的试纸条检测阳性样本时,结果全为阳性,可知阳性符合率为100%,假阴性率为0;检测阴性样本时,结果全为阴性,可知阴性符合率为100%,假阳性率为0。说明本发明的检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条可以对烟叶中异菌脲进行快速检测。

[0069] 3、特异性试验

用异菌脲试纸条检测1 mg/L的腐霉利、菌核净、乙烯菌核利等其他二甲酰亚胺类杀菌剂,结果显示,荧光检测仪检测为阴性。说明本试纸条对腐霉利、菌核净、乙烯菌核利等与异菌脲结构类似的化合物无交叉反应,特异性良好。

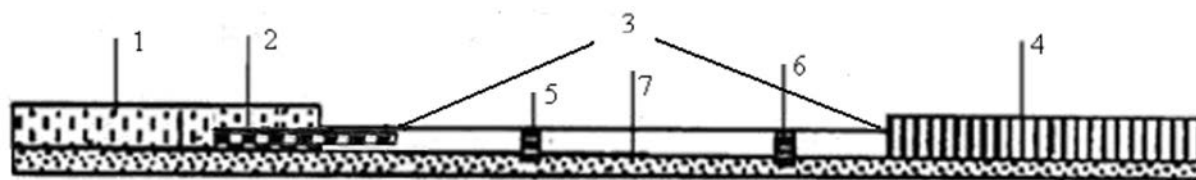


图1

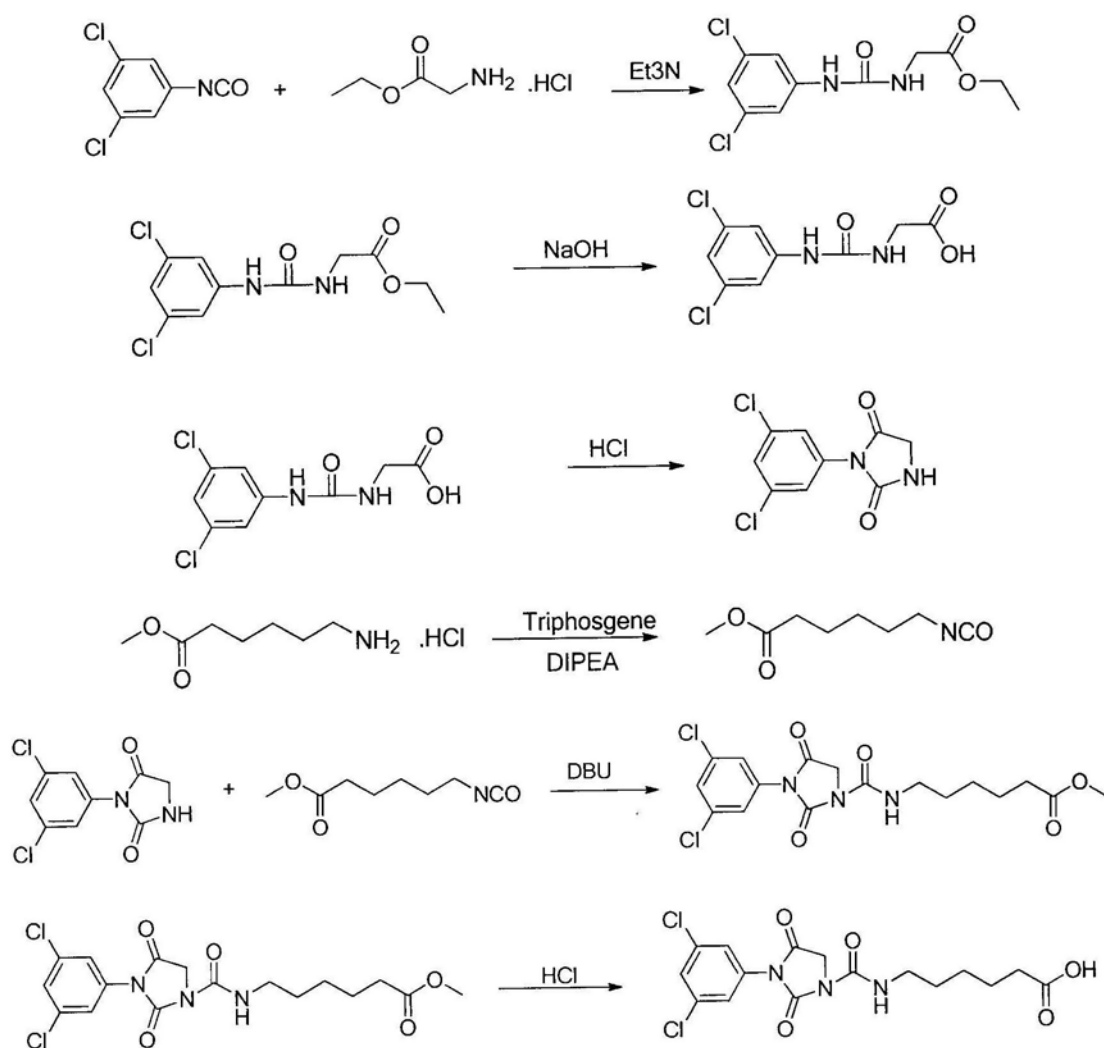


图2

专利名称(译)	一种检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109061153A	公开(公告)日	2018-12-21
申请号	CN201811104585.6	申请日	2018-09-21
[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		
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		
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		
[标]发明人	陈黎 范子彦 刘惠民 唐纲岭 崔华鹏 樊美娟 赵乐 王晓瑜 秦亚琼 王洪波		
发明人	陈黎 范子彦 刘惠民 唐纲岭 崔华鹏 樊美娟 赵乐 王晓瑜 秦亚琼 王洪波		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/58 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/558 G01N21/6408 G01N33/533 G01N33/582 G01N33/585		
代理人(译)	姜振东		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测异菌脲的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用。该试纸条包括底板及在底板上依次搭接粘贴的样品吸收垫、结合物释放垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，结合物释放垫上包埋有荧光微球标记的异菌脲单克隆抗体，硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区，检测区喷涂有异菌脲半抗原-载体蛋白偶联物，质控区喷涂有羊抗鼠抗体，异菌脲半抗原是由3,5-二氯苯异氰酸酯与甘氨酸乙酯盐酸盐、6-氨基己酸甲酯盐酸盐等经过一系列反应得到。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、成本低的优点，能实现对大批量样品中异菌脲的快速检测。

