(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105277704 A
(43)申请公布日 2016.01.27

(21)申请号 201410352358.0

(22)申请日 2014.07.23

(71)申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司
地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯国家科技园 B11 栋 3 楼

(72)发明人 杜道林 戴蔚蔚 洪霞

(51)Int.Cl.
G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种快速检测农作物中茅草枯含量的试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种能检测棉花、黄麻中茅草枯的酶联免疫试剂盒，涉及免疫分析检测技术。该试剂盒包括：包被了茅草枯的酶标板；茅草枯抗体；茅草枯标准品；标准品稀释液；酶标二抗；底物显色液；洗涤缓冲液和终止液。本发明的关键技术在于制备了一种可以识别茅草枯的单克隆抗体。本发明的试剂盒采用此高特异性的茅草枯单克隆抗体，主要试剂以工作液形式提供，可以减少操作步骤，节省时间。

CN 105277704 A

1. 一种用于茅草枯快速检测的酶联免疫试剂盒，其特征在于它包含下列成分：

（1）包被了茅草枯抗原的酶标板

（2）茅草枯抗体

（3）茅草枯标准品

（4）标准品稀释液

（5）酶标二抗

（6）底物显色液

（7）洗涤缓冲液

（8）终止液

其中，本发明的试剂盒所用试剂的配制方法如下：

（1）茅草枯标准溶液配制：准确称取标准茅草枯 1 mg，精确到 0.00001 g，配成 1 μg/mL 标准品溶液母液；使用时，用标准品稀释液稀释成所需的浓度（10-1000 ng/mL）；

（2）标准品稀释液为 0.05 mol/L Tris-HCl，pH 8.0，0.9%NaCl 的缓冲液；

（3）包被缓冲液为 0.1 mol/L 碳酸缓冲液，pH7.8，含 0.05% NaN_3，0.9% NaCl；

（4）封闭液为 0.05 mol/L Tris-HCl 溶液，pH8.0，含 0.5% BSA，0.9% NaCl，0.04% NaN_3；

（5）洗涤缓冲液为 0.05 mol/L Tris-HCl，pH 8.0，0.9% NaCl，0.04% Tween20；

（6）茅草枯单克隆抗体工作液：将抗体用 pH7.4，0.02 mol/L，含 1% 卵清蛋白的磷酸盐缓冲液稀释成蛋白浓度为 0.1-1 μg/L 使用；

（7）酶标二抗工作液：辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗；

（8）底物显色液 A 液：过氧化氢或过氧化脲；

（9）底物显色液 B 液：邻苯二胺（OPD）或四甲基联苯胺（TMB）；

（10）底物显色液对硝基磷酸盐缓冲液：pH8.1，含有 $MgCl_2$ 0.01% 100 mmol/L Tris-HCl；

（11）终止液：2 mol/L 硫酸。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于包被抗原的制备：将载体蛋白（BSA）的羧基用乙二胺活化，再通过水溶性碳化二亚胺法（EDC）将茅草枯与活化载体蛋白（BSA）的氨基相偶联制备茅草枯抗原。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于识别茅草枯单克隆抗体制备：

a、动物免疫程序：采用茅草枯人工抗原为免疫原，免疫 BALB/C 小鼠，免疫剂量为 50 μg，首次免疫为含弗氏完全佐剂的免疫原，颈背部皮下多点注射，以后每隔四周，用含弗氏不完全佐剂的免疫原加强免疫，前后共四次，可以得到血液里含有茅草枯特异性抗体的小鼠；最后一次免疫后 10 天，采血，取脾细胞；

b、细胞融合与克隆化：取免疫 BALB/C 小鼠脾细胞，按照 5:1 的比例与小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞杂交融合，制备杂交瘤细胞，采用间接竞争酶联免疫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，筛选能稳定分泌茅草枯单克隆抗体的杂交瘤细胞株；

c、单克隆抗体的制备与纯化：采用体内诱生法，将 BALB/C 小鼠腹腔注入 0.5 mL 灭菌石蜡油，7-14 天后腹腔注射杂交瘤细胞，7-10 天后采集腹水，经硫酸铵盐析纯化，分装待用，-20℃保存。

一种快速检测农作物中茅草枯含量的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于农药残留分析和免疫分析检测技术领域，具体涉及一种能识别茅草枯的单克隆抗体制备及其酶联免疫检测试剂盒。本发明公开了特异性单克隆抗体、包被原、免疫原的制备方法和酶联免疫检测方法。与现有技术相比，本发明制备的单抗可以识别茅草枯，本发明的试剂盒和方法具有简便、快速、灵敏、准确等优点。

背景技术

[0002] 茅草枯是一种选择性内吸传导型除草剂，低毒，具有致癌性、致突变型和致畸性，因此安全问题受到高度重视。

[0003] 目前，HPLC 是测定茅草枯的主要手段，由于这类方法存在分析时间长、检测所需样品量大、及繁琐的前处理步骤等不足，不适宜于测定大量样品。与此相比，免疫学方法具有低成本、快速、无需复杂样品前处理等特点，可作为一种高效的检测方法。

发明内容

[0004] (一) 本发明要解决的技术问题

本发明目的在于提供一种结构简单、使用方便、价格便宜、便于携带、灵敏度高的用于茅草枯同时快速检测的酶联免疫试剂盒，并提供一种高效、准确、灵敏、适合大量筛选的定量检测方法。

[0005] (二) 本发明的技术方案

为解决所述问题，本发明综合采用蛋白质偶联和生物化学制备等技术制备了可以识别茅草枯的单克隆抗体。将茅草枯与载体蛋白偶联制备成人工免疫抗原和包被抗原；用此人工免疫抗原免疫动物制备茅草枯的单克隆抗体；将茅草枯包被抗原包被吸附于固相载体上；将检测用的试剂配置成可直接使用的试剂。使用时，将茅草枯标准品或待测样品加入茅草枯抗体工作液，待测样品中残留的茅草枯与固相载体上包被的茅草枯抗原竞争茅草枯单克隆抗体，再加入酶标记二抗进行酶活性放大作用，显色后终止，测定样品的吸光度值，该值与样品中茅草枯残留呈负相关，与标准曲线比较即可得出样品中茅草枯的含量。

[0006] 本酶联免疫检测试剂盒由下列成分组成：

(1) 包被了茅草枯抗原的酶标板；

(2) 茅草枯抗体；

(3) 茅草枯标准品；

(4) 标准品稀释液；

(5) 酶标二抗；

(6) 底物显色液；

(7) 洗涤缓冲液；

(8) 终止液。

[0007] 其中，茅草枯抗原及茅草枯单克隆抗体的制备方法为：

（1）茅草枯抗原的合成

将载体蛋白（BSA）的羧基用乙二胺活化，再通过水溶性碳化二亚胺法（EDC）将茅草枯与活化载体蛋白（BSA）的氨基相偶联制备茅草枯抗原。具体步骤见下。本发明合成的免疫原采用免疫电泳测定其纯度为98.6%。

[0008] （2）茅草枯单克隆抗体制备

动物免疫程序：采用茅草枯抗原为免疫原，免疫BALB/C小鼠，免疫剂量为50 μg，首次免疫为含弗氏完全佐剂的免疫原，以后每隔四周，用含弗氏不完全佐剂的免疫原加强免疫，前后共四次，可以得到血液里含有茅草枯抗原特异性抗体的小鼠；最后一次免疫后10天，采血，取脾细胞。

[0009] 细胞融合与克隆化：取免疫BALB/C小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞杂交融合，制备杂交瘤细胞，采用间接竞争酶联免疫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，筛选能稳定分泌茅草枯单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0010] 单克隆抗体的制备与纯化：采用体内诱生法，将BALB/C小鼠腹腔注入灭菌石蜡油，7-14天后腹腔注射杂交瘤细胞，7-10天后采集腹水，经硫酸铵盐析纯化，分装待用，-20℃保存。

[0011] 其中，本发明的试剂盒所用试剂的配制方法如下：

（1）茅草枯标准溶液配制：准确称取标准茅草枯1 mg，精确到0.00001 g，配成1 μg/mL标准品溶液母液；使用时，用标准品稀释液稀释成所需的浓度（10-1000 ng/mL）；

（2）标准品稀释液为0.05 mol/L Tris-HCl，pH 8.0，0.9%NaCl的缓冲液；

（3）包被缓冲液为0.1 mol/L碳酸缓冲液，pH7.8，含0.05% NaN_3，0.9% NaCl；

（4）封闭液为0.05 mol/L Tris-HCl溶液，pH8.0，含0.5% BSA，0.9% NaCl，0.04% NaN_3；

（5）洗涤缓冲液为0.05 mol/L Tris-HCl，pH 8.0，0.9% NaCl，0.04% Tween20；

（6）茅草枯单克隆抗体工作液：将抗体用pH7.4，0.02 mol/L，含1%卵清蛋白的磷酸盐缓冲液稀释成蛋白浓度为0.1-1 μg/L使用；

（7）酶标二抗工作液：辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗；

（8）底物显色液A液：过氧化氢或过氧化脲；

（9）底物显色液B液：邻苯二胺（OPD）或四甲基联苯胺（TMB）；

（10）底物显色液对硝基磷酸盐缓冲液：pH8.1，含有$MgCl_2$ 0.01% 100 mmol/L Tris-HCl；

（11）终止液：2 mol/L硫酸。

[0012] 其中，酶标板的包被方法为：包被抗原以合适浓度与包被缓冲液混合，添加于酶标板中且置于室温下反应14 h。用洗涤缓冲液洗涤3次后，用封闭缓冲液在37℃进行封闭（约1 h），去除孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

[0013] 本发明试剂盒的检测原理和检测方法：

将茅草枯抗原偶联物包被吸附于固相载体上，加入茅草枯标准品或待测样品，并加入茅草枯抗体工作液，待测样品中残留的茅草枯与固相载体上包被的茅草枯抗原竞争茅草枯单克隆抗体，洗涤去除游离的抗原抗体复合物，再加入酶标记二抗进行酶活性放大作用，显色后终止，测定样品的吸光度值，该值与样品中茅草枯残留呈负相关，与标准曲线比较即可得出样品中茅草枯的含量。

[0014] (三)本发明的有益效果

本发明所制备的能识别茅草枯的酶联免疫试剂盒,具有简便、快速、灵敏、准确等特点,可用于定性或定量检测果蔬等样品中茅草枯的残留量;其最低检测限为0.01 ng/g,检测时间仅需3小时。本方法平均回收率为97-121%,批内误差小于8%,批间误差小于13%。

[0015] 本发明的试剂盒采用高特异性的茅草枯单克隆抗体,主要试剂以工作液形式提供,可以减少操作步骤,节省时间。

附图说明

[0016] 图1为茅草枯的标准曲线。

具体实施方式

[0017] 实施例1 试剂盒组分的制备

1、抗原的合成

a、取载体牛血清白蛋白(BSA)10 g 溶于35 mL pH9.6 碳酸盐缓冲液中,加入10g 乙二胺进行活化;

b、取茅草枯1 g溶于10 mL 0.5 M的氢氧化钠溶液中;

c、取1 g碳化二亚胺溶于5 mL纯水,然后加到茅草枯溶液中室温搅拌反应3小时;

d、将活化的载体蛋白BSA滴加到茅草枯溶液中4℃搅拌反应过夜;

e、将反应完所获得的人工抗原对0.1 M的PBS缓冲液透析5天,每天更换缓冲液4次;将获得的纯化的人工抗原经超滤浓缩或冻干保存。

[0018] 2、茅草枯单克隆抗体制备

a、动物免疫程序:采用茅草枯人工抗原为免疫原,免疫BALB/C小鼠,免疫剂量为50μg,首次免疫为含弗氏完全佐剂的免疫原,颈背部皮下多点注射,以后每隔四周,用含弗氏不完全佐剂的免疫原加强免疫,前后共四次,可以得到血液里含有茅草枯特异性抗体的小鼠;最后一次免疫后10天,采血,取脾细胞。

[0019] b、细胞融合与克隆化:取免疫BALB/C小鼠脾细胞,按照5:1的比例与小鼠SP2/0骨髓瘤细胞杂交融合,制备杂交瘤细胞,采用间接竞争酶联免疫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,筛选能稳定分泌茅草枯单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0020] c、单克隆抗体的制备与纯化:采用体内诱生法,将BALB/C小鼠腹腔注入0.5 mL灭菌石蜡油,7-14天后腹腔注射杂交瘤细胞,7-10天后采集腹水,经硫酸铵盐析纯化,分装待用,-20℃保存。

[0021] 3、酶标二抗的制备

将辣根过氧化物酶(HRP)与羊抗鼠二抗进行偶联,方法如下:

a、8 mg辣根过氧化物酶溶解于2 mL蒸馏水中;

b、加入现配制的100 mmol/L $NaIO_4$溶液0.4 mL,室温搅拌反应20分钟;

c、在4℃条件下,用1 mmol/L醋酸盐缓冲液透析过夜;

d、加入pH8.6,0.5 mol/L磷酸盐缓冲液40 μL和含有羊抗鼠二抗蛋白IgG 16 mg的pH8.6,5 mol/L磷酸盐缓冲液2 mL,室温搅拌反应5小时;

e、加入现配制的 $NaBH_4$ 水溶液（1 mol/L）0.1 mL 4℃反应 5 小时；

f、纯化保存。

[0022] 4、酶标板的制备

a、用包被缓冲液将包被抗原稀释至 0.05 μg/mL；

b、于酶标板中每孔加入 150μL，且置于室温下反应 14 h；

c、去除包被液，用洗涤缓冲液洗涤 3 次后，用封闭缓冲液 150 μL 在 37℃进行封闭（约 1 h），去除孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

[0023] 实施例 2 用于茅草枯快速检测的酶联免疫试剂盒的组建

本酶联免疫检测试剂盒由下列成分组成：

（1）包被了茅草枯抗原的酶标板；

（2）蛋白浓度为 0.5 μg/L 的茅草枯单克隆抗体工作液；

（3）浓度为 1 μg/mL 茅草枯标准品；

（4）标准品稀释液：0.05 mol/L Tris-HCl，pH 8.0，0.9%NaCl 的缓冲液；

（5）用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠酶标二抗工作液；

（6）底物显色液 A 液位过氧化氢，底物显色液 B 液位邻苯二胺；

（7）洗涤缓冲液为 0.05 mol/L Tris-HCl，pH 8.0，0.9% NaCl，0.04% Tween20；

（8）终止液为 2 mol/L 硫酸。

[0024] 实施例 3 样品中茅草枯残留的检测

1、样品前处理

a、取 1 g 粉碎并具有代表性的样品，加入 5mL 丙酮；

b、充分振荡混匀 3-5 分钟，静置分层后取 5 mL 上清液 4000 r/min 离心 5 min 或用定量分析滤纸过滤；

c、取离心后的上清液或过滤后的滤液 1 mL，50 ~60 ℃水浴氮气吹干；

d、加入标准品稀释液 1 mL 并充分混匀，4000 r/min 离心 5 min 或用定量分析滤纸过滤；

e、取离心后的上清或过滤后的滤液进行分析。

[0025] 2、用试剂盒进行检测

配制浓度为 1000 ng/mL 茅草枯母液，进行倍比稀释，分别稀释为 0，0.3，0.9，2.7，8.1，24.3 ng/mL 6 个浓度的标准品，按照 100μL 标准品或待测样品和 50 μL 茅草枯单克隆抗体工作液共 150μL 添加于包被有茅草枯抗原的酶标板微孔中，于 25℃进行竞争反应 1 h。竞争反应结束后，倒出孔中液体，每孔加入 250μL 洗涤液，30 秒后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸吸干。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗工作液 100μL，用盖板膜封板，于 25℃恒温反应 30 min。取出酶标板，如前述洗板 5 次。每孔加入底物显色液 A 液 50μL，再加 B 液 50μL，轻轻震荡混匀，于 25℃恒温反应 15 min。加入终止液 50μL/孔，轻轻振荡混匀，设定酶标仪于 450 nm 处或双波长 450/630 nm 检测，测定每孔吸光度值（请在 5 min 内读完数据）。

[0026] 结果分析：

测量吸光度值（OD 值）并绘制标准曲线，所测标准品的吸光度值（OD 值）对应茅草枯浓度作标准曲线图，相对应每一个样品中茅草枯的浓度可以从标准曲线上读出，从而得到所

测样品的茅草枯含量。

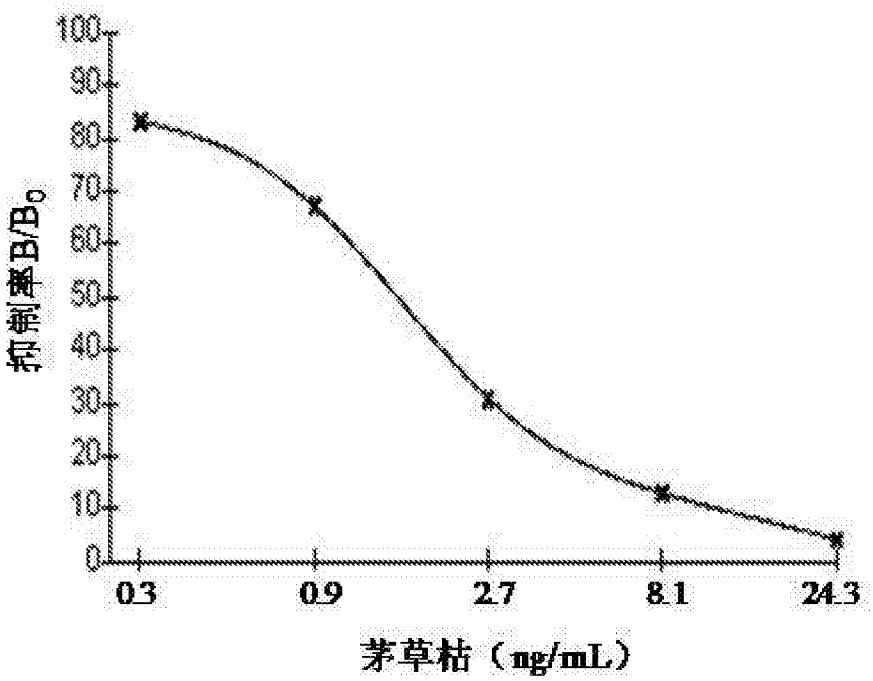

图 1

专利名称(译)	一种快速检测农作物中茅草枯含量的试剂盒		
公开(公告)号	CN105277704A	公开(公告)日	2016-01-27
申请号	CN201410352358.0	申请日	2014-07-23
[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	杜道林 戴蔚蔚 洪霞		
发明人	杜道林 戴蔚蔚 洪霞		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种能检测棉花、黄麻中茅草枯的酶联免疫试剂盒，涉及免疫分析检测技术。该试剂盒包括：包被了茅草枯的酶标板；茅草枯抗体；茅草枯标准品；标准品稀释液；酶标二抗；底物显色液；洗涤缓冲液和终止液。本发明的关键技术在于制备了一种可以识别茅草枯的单克隆抗体。本发明的试剂盒采用此高特异性的茅草枯单克隆抗体，主要试剂以工作液形式提供，可以减少操作步骤，节省时间。