



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105572341 A

(43) 申请公布日 2016.05.11

(21) 申请号 201410523945.1

(22) 申请日 2014.10.08

(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 洪霞 戴蔚蔚

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测扑草净的酶联免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测扑草净的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测扑草净的酶联免疫试剂盒,包括包被的扑草净与载体蛋白的偶联物,所述扑草净的特异性抗体和酶标二抗。本发明的检测扑草净的酶联免疫试剂盒为多残留检测试剂盒,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样品;最低检测限达 $10\mu\text{g/kg}$ 以下,可直接判断样品是否超标,具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点,可在动物性食品扑草净残留检测中发挥重要作用。

1. 一种检测扑草净的酶联免疫试剂盒,包括包被的扑草净与载体蛋白的偶联物,所述扑草净的特异性抗体和酶标二抗。

2. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括A, B, C, D, E, F试剂液、G试剂液、H试剂液、I试剂液、J试剂液、K试剂液、L试剂液和M试剂液。

3. 根据权利要求1或2所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述扑草净的特异性抗体为扑草净单克隆抗体或扑草净多克隆抗体。

4. 根据权利要求3所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述扑草净单克隆抗体或多克隆抗体为鼠源、马源、羊源、猪源、兔源或豚鼠源抗体。

5. 根据权利要求4所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于扑草净单克隆抗体为扑草净鼠单克隆抗体。

6. 根据权利要求5所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述扑草净多克隆抗体为扑草净兔克隆抗体。

7. 根据权利要求1或2所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、兔血清白蛋白、甲状腺球蛋白、卵清蛋白或血兰蛋白。

8. 根据权利要求1或2所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。

9. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述检测扑草净的酶联免疫检测盒,包括包被的扑草净与载体蛋白的偶联物,扑草净的特异性抗体和酶标二抗。

一种检测扑草净的酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫和农药残留监测分析技术领域中的一种检测扑草净的酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 扑草净难溶于水,易溶于有机溶剂,是内吸选择性除草剂。可经根和叶吸收并传导。对刚萌发的杂草防效最好,杀草谱广,可防除年生禾本科杂草及阔叶杂草。适用于棉花、大豆、麦类、花生、向日葵、马铃薯、果树、蔬菜、茶树及水稻田。为了控制农药残留,保障人类健康,有必要建立一种快速、有效的残留检测方法对其残留进行检测。现有的残留检测方法主要有液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)、高效薄层色谱(HPTLC)、高效液相色谱(HPLC)和荧光法分析方法。虽然高效液相和质谱检测等仪器方法,在鉴定药物种类和定量分析上表现出良好的性能,但由于其操作复杂、分析费用昂贵,而不适用于对大量样品进行残留筛选。免疫分析技术以其灵敏、特异、快速、简便等优点在药物残留检测领域已被广泛应用。

发明创造内容

[0003] 本发明的目的是提供一种检测扑草净的酶联免疫试剂盒。

[0004] 本发明所提供的检测扑草净的酶联免疫试剂盒,包括包被的扑草净与载体蛋白的偶联物,所述扑草净的特异性抗体和酶标二抗。

[0005] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括 A, B, C, D, E, F 试剂液、G 试剂液、H 试剂液、I 试剂液、J 试剂液、K 试剂液、L 试剂液和 M 试剂液。

[0006] 所述 A, B, C, D, E, F 试剂液为扑草净系列浓度标准溶液。

[0007] 所述 G 试剂液为蛋白浓度为 0.1—10mg/L 的酶标二抗。

[0008] 所述 H 试剂液为蛋白浓度为 0.1—10mg/L 的扑草净单克隆抗体或多克隆抗体。

[0009] 所述 I 试剂液为四甲基联苯胺。

[0010] 所述 J 试剂液为含 0.1—10%BSA 的磷酸盐缓冲液。

[0011] 所述 K 试剂液为含 0.05% 吐温的磷酸盐缓冲液。

[0012] 所述 L 试剂液为柠檬酸缓冲液。

[0013] 所述 M 试剂液为终止液。

[0014] 所述扑草净的特异性抗体为扑草净单克隆抗体或扑草净多克隆抗体;所述扑草净单克隆抗体或多克隆抗体为鼠源、马源、羊源、猪源、兔源或豚鼠源抗体,所述扑草净单克隆抗体优选为扑草净扑草净鼠克隆抗体,所述扑草净多克隆抗体优选为扑草净兔多克隆抗体。

[0015] 以上抗体均可用扑草净与载体蛋白的偶联物作为免疫原按常规方法制备。

[0016] 所述载体蛋白可谓牛血清蛋白(BSA)、人血清蛋白(HSA)、兔血清蛋白(RSA)、甲状腺球蛋白(TG)、卵清蛋白(OVA)或血兰蛋白(KLH)等常用载体蛋白;所述扑草净与载体蛋白的偶联物可采用甲醛法、联氨法、重氮化法或 EDS 法合成。

[0017] 所述标记酶可谓辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶,优选为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶可通过戊二醛法或高碘酸钠法交联在二抗体上;所述二抗可为抗鼠或抗兔抗体。

[0018] 可作为固定扑草净与载体蛋白的偶联物的载体的物质很多,如聚苯乙烯、纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚丙烯、交联葡聚糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等。该载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等。

[0019] 在优选的条件下,本发明的检测扑草净的酶联免疫试剂盒,包括包被的扑草净与载体蛋白的偶联物,扑草净的特异性抗体和酶标二抗。

[0020] 本发明的检测原理为将扑草净与载体蛋白的偶联物做包被原吸附于固相载体上,加入样品和扑草净特异性抗体,再加入酶标二抗,待测样品中残留的扑草净和固相载体上包被的扑草净与载体蛋白的偶联物竞争结合特异性抗体,显色后终止,测定样品吸光值,该值与样品中扑草净残留物含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出扑草净的含量。同时根据酶标板上的样品颜色的深浅,与系列浓度的扑草净标准溶液颜色的比较可判断样品的浓度范围。

[0021] 本发明的检测多喜欢换算的酶联免疫试剂盒为多残留检测试剂盒,主要采用间接竞争 ELISA 方法定性或定量检测植物中扑草净的残留量;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样品;最低检测限达 $10 \mu\text{g/kg}$ 以下,可直接判断样品是否超标,具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点,可在果蔬性食品扑草净残留检测中发挥重要作用。

附图说明

[0022] 图 1 为试剂盒的标准曲线。

具体实施方式

[0023] 实施例 1、抗原及抗体的制备

(1) 包被抗原的合成

将扑草净和兔血清白蛋白(RSA)采用甲醛法、联氨法、EDC 或重氮化法进行偶联得到包被抗原。

[0024] (2) 免疫(抗)原的合成

将扑草净和人血清白蛋白采用甲醛法、联氨法、EDC 或重氮化法进行偶联得到免疫(抗)原。

[0025] (3) 扑草净兔克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物,以扑草净与人血清白蛋白偶联物为免疫原,首次免疫用 2mg/mL 免疫抗原 2mL 加完全福氏佐剂 2mL 乳化,加强免疫用免疫抗原 1mL 加 1mL 不完全福氏佐剂乳化。在白兔背部两侧各取 $5\sim 10$ 点,每点皮下注射抗原 $0.2\sim 0.3 \text{ mL}$,四周后加强免疫,共加强免疫 $5\sim 10$ 次,每次加强免疫间隔 2 周,最后一次免疫 7 天后采血,测定血清抗体效价,颈动脉放血,提取血清,经硫酸铵分级沉淀得到春花的多克隆抗体。

[0026] (4) 扑草净鼠单克隆抗体的制备

动物免疫程序采用 BALB/C 小鼠作为免疫动物,以扑草净与人血清白蛋白偶联物为免

疫原,免疫剂量为 50g(0.1mL) 免疫原加等体积完全福氏佐剂乳化,进行首次皮下注射免疫。一月后,取同样量免疫抗原加等量不完全福氏佐剂乳化,进行加强免疫,再过一月后,取同样量免疫抗原不加佐剂腹腔注射进行加强免疫,之后 5 天采血,测定抗体效价,取脾细胞。

[0027] 细胞融合与克隆化:取免疫 BALA/C 小鼠脾细胞,按 4:1 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。利用有限稀释或软琼脂平板法对阳性孔进行克隆化,得到完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株。

[0028] 细胞冻存和复苏:取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 $10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个/mL 的细胞悬液,分装于冻存管,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。

[0029] 单克隆抗体的制备与纯化:采用体内诱生法,将 BALA/C 小鼠(8 周龄)腹腔注入灭菌石蜡油 0.5mL/只,7-14 天后腹腔注射杂交瘤细胞 $5 \times 10^5 \sim 10^6$ 个/只,7~10 天后采集腹水。经辛酸—硫酸铵沉淀法进行腹水纯化,小瓶分装, -20℃ 保存。

[0030] 二抗的制备:以羊作为免疫动物,以鼠或兔 IgG 为免疫原进行免疫,得到羊抗鼠或羊抗兔抗体。

[0031] 用高碘酸钠法多戊二醛法合成辣根过氧化物酶—羊抗兔 IgG 或辣根过氧化物酶—羊抗鼠 IgG 标记物。

[0032] 实施例 2、检测扑草净的酶联免疫试剂盒

(1) 检测扑草净的酶联免疫试剂盒的结构

该试剂盒主要由盒体、铝膜真空包装 96/40 孔酶标板、A, B, C, D, E, F 试剂液(扑草净系列浓度标准溶液)、G 试剂液(酶结合二抗)、H 试剂液(扑草净抗体)、J 试剂液(含 BSA 磷酸盐缓冲液);K 试剂液(含吐温—20 磷酸盐缓冲液);I 试剂液(四甲基联苯胺);L 试剂液(柠檬酸缓冲液);M 试剂液(终止液);F、G、H、I 试剂瓶。托架,酶标板, J 试剂瓶, K 试剂瓶, L 试剂瓶, M 试剂瓶和盖板膜均安装在盒体内。酶标板由塑料支架和各自分开的带孔的塑料条组成。

[0033] (2) 所用试剂的配制

A, B, C, D, E, F 试剂液:扑草净系列浓度标准溶液,其浓度分别为 0、3、10、30、100、300 μ g/L。

[0034] G 试剂液:蛋白浓度为 0.1~10mg/L 的辣根过氧化物酶—羊抗兔标记或辣根过氧化物酶—羊抗鼠 IgG 标记物。

[0035] H 试剂液:蛋白浓度为 0.1~10mg/L 的扑草净单克隆抗体或兔多克隆抗体。

[0036] I 试剂液:1~10mg/mL 四甲基联苯胺溶液。

[0037] J 试剂液:含 0.1~10% BSA 的磷酸盐缓冲液(0.01M pH7.2)。

[0038] K 试剂液:含 0.5% 吐温的磷酸盐缓冲液(0.5M pH7.2)。

[0039] L 试剂液:0.1M pH5.0 柠檬酸缓冲液。

[0040] M 试剂液:1~2mol/L 硫酸或盐酸。

[0041] (3) 酶标板的制备

用包被缓冲液(0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液)将扑草净包被抗原 0.1~1 μ g/mL,每孔加入 100 μ L,37℃ 温育 2h,4℃ 过夜,倾去包被缓冲液,用 10 倍稀释的 K 试剂液洗涤 3 次,每次

30 秒,拍干,然后在每孔中加入 5%脱脂牛奶 0.05M 磷酸盐缓冲液 250 μ L,37℃温育 2h,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0042] 实施例 3、样品的前处理及检测

1、选取植物组织,将筛选后的空白组织剪碎,用均质机 4000r/min 均质 5min,称取组织均质物 1.0g 于 50mL 离心管中,加入 3%三氯乙酸 4mL,漩涡混匀,颠倒震荡 20min,室温 10000r/min 离心 10min。取上清液 200 μ L 于 1.5mL 离心管中,加入 1mol/L 氢氧化钠溶液 20 mL,漩涡混匀,加入样品缓冲液 180 μ L,混匀,以 10000r/min 离心 5min,上清液作为试样溶液,稀释因子为 10。

[0043] 2、检测

检测前将试剂盒恢复室温(18℃~30℃),再用 A,B,C,D,E,F 试剂液与 J 试剂液配制扑草净标准溶液 0、2.5、5、10、20、40 μ g/L, K 试剂液加水配制成洗液(0.05%吐温的磷酸盐缓冲液),用 H 试剂液与洗液配制抗体溶液(0.1mg/L),在酶标板小孔中加入 50 μ L 样品溶液或配制好的扑草净标准溶液,加入 50 μ L 抗体溶液,覆上盖板膜于 18℃~30℃放置 1h,用洗液洗酶标板 3 次,用吸水纸拍干,之后用 G 试剂与洗液配置酶标抗体溶液(0.1mg/L)并加入酶标小孔中,18℃~30℃放置 30min,再用洗液洗酶标板 3 次,拍干,用 I 试剂液配制酶底物混合液(0.1%四甲基联苯胺的柠檬酸缓冲液),取 100 μ L 加入酶标板小孔后混匀,避光显色约 15min,最后每孔加入 M 终止液(1mol/L 硫酸)100 μ L,用酶标仪测定 450nm 处 A_{450} 值。按下式计算百分吸光度值:

(B—准溶液或样品的平均吸光度值; B_0 —为 0 浓度的标准溶液平均吸光度值)

百分吸光度值 = $B/B_0 \times 100\%$

以标准溶液中扑草净浓度的对数为 X 轴,百分吸光度值为 Y 轴,绘制标准曲线,从标准曲线上计算出试样溶液中扑草净浓度。

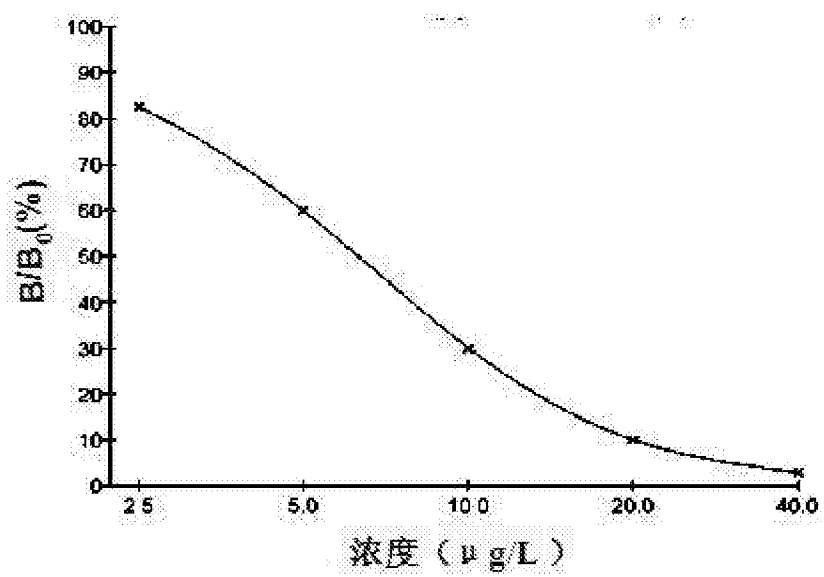


图 1

专利名称(译)	一种检测扑草净的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN105572341A	公开(公告)日	2016-05-11
申请号	CN201410523945.1	申请日	2014-10-08
[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		
[标]发明人	杜道林 洪霞 戴蔚蔚		
发明人	杜道林 洪霞 戴蔚蔚		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测扑草净的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测扑草净的酶联免疫试剂盒，包括包被的扑草净与载体蛋白的偶联物，所述扑草净的特异性抗体和酶标二抗。本发明的检测扑草净的酶联免疫试剂盒为多残留检测试剂盒，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样品；最低检测限达10 μ g/kg以下，可直接判断样品是否超标，具有高特异性、高灵敏度、高精度度、高准确度等特点，可在动物性食品扑草净残留检测中发挥重要作用。

