



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106872706 A

(43)申请公布日 2017.06.20

(21)申请号 201710061067.X

(22)申请日 2017.01.25

(83)生物保藏信息

CCTCC NO.C201654 2016.03.29

(71)申请人 中国农业科学院油料作物研究所

地址 430062 湖北省武汉市武昌区徐东二  
路2号

(72)发明人 李培武 李慧 杨青青 唐晓倩

张奇 张文 张兆威 丁小霞

(74)专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限

公司 42102

代理人 乔宇

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书3页 说明书8页

序列表2页 附图1页

(54)发明名称

一种用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法

(57)摘要

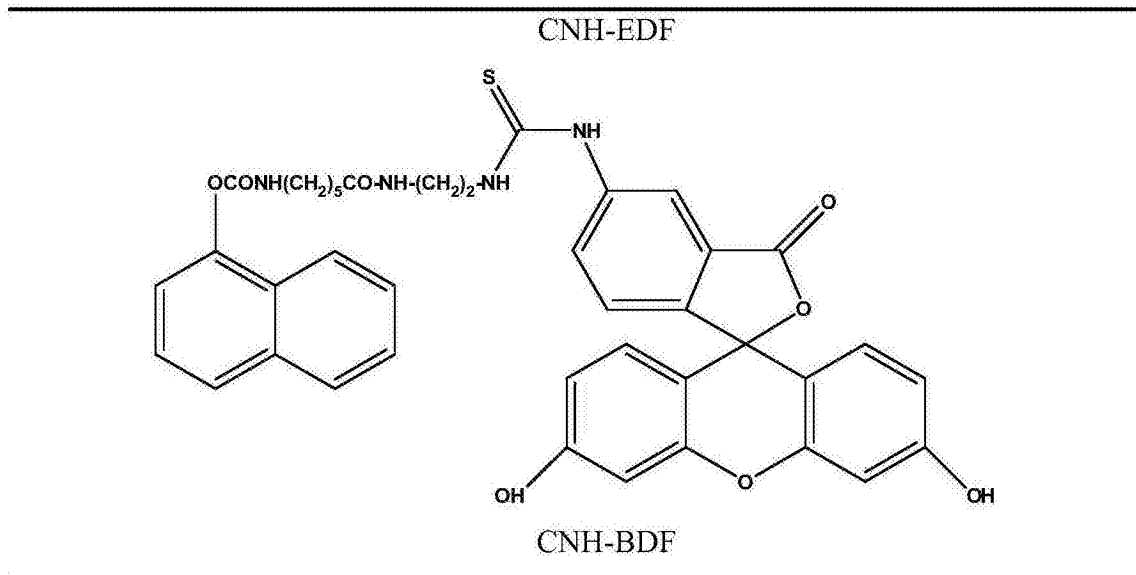
本发明涉及一种用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法。该方法为：将待测样品与上述荧光标记物溶液以及甲萘威单克隆抗体溶液混合，孵育进行竞争反应，测定所得体系的荧光偏振值，根据荧光偏振值-甲萘威标准样品中甲萘威浓度标准曲线，计算所述待测样品中甲萘威的浓度。本发明提供的甲萘威荧光偏振免疫检测方法(Fluorescence Polarization Immunoassay, FPIA)方法只需要加样，无需分离和洗涤操作，十分钟内就可获得检测结果。能够满足甲萘威的残留检测限量要求。

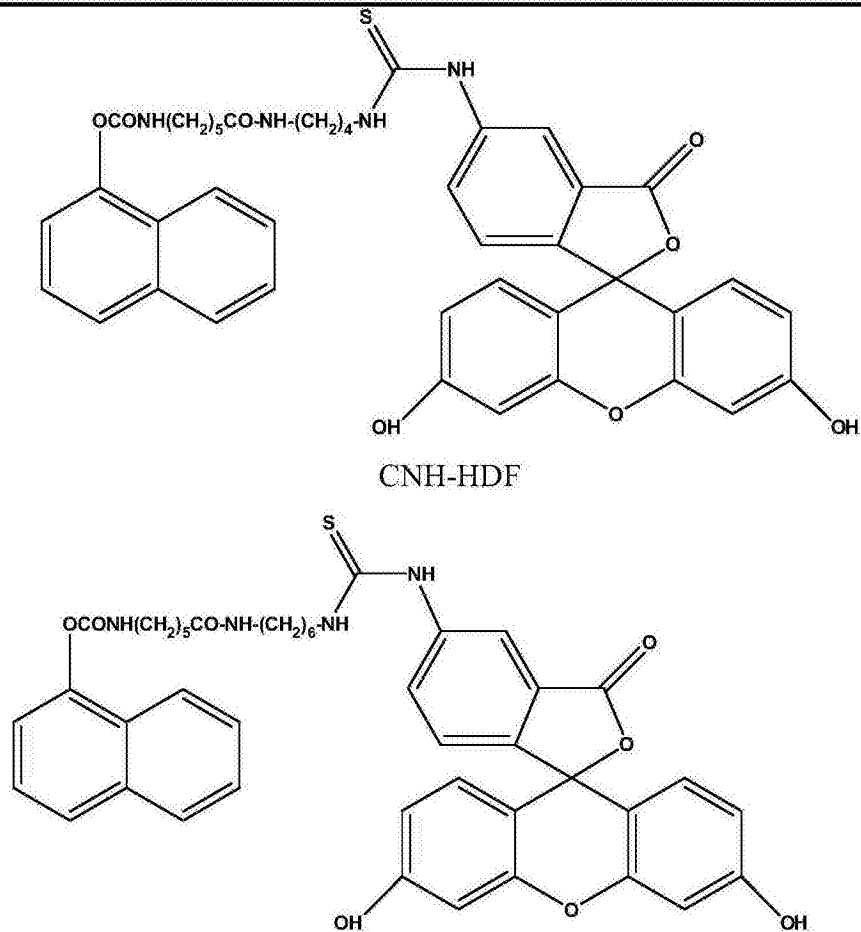
1. 用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法,其特征在於:将待测样品与所述荧光标记物溶液以及甲萘威单克隆抗体溶液混合,孵育进行竞争反应,测定所得体系的荧光偏振值,根据荧光偏振值-甲萘威标准样品中甲萘威浓度标准曲线,计算所述待测样品中甲萘威的浓度。

2. 根据权利要求1所述的用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法,其特征在於:所述的荧光偏振值-甲萘威标准样品中甲萘威的浓度标准曲线是采用以下方法获得的:将一系列已知浓度的甲萘威标准品的溶液分别与荧光标记物溶液以及甲萘威单克隆抗体溶液混合,孵育进行竞争反应,测定所得体系的荧光偏振值;以测定的荧光偏振值为纵坐标,所述一系列已知浓度的甲萘威标准品的浓度为横坐标,绘制标准曲线。

3. 根据权利要求1所述的用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法,其特征在於:所述荧光标记物为甲萘威半抗原6-(1-萘氧基甲酰胺基)-己酸与荧光素的酰胺偶联物。

4. 根据权利要求1所述的用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法,其特征在於:所述荧光素选自下述任意一种:异硫氰酸荧光素乙二胺,异硫氰酸荧光素丁二胺,异硫氰酸荧光素己二胺;所述荧光标记物具有下表所示的结构;





5. 根据权利要求1所述的用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法,其特征在于:所述甲萘威单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO:C201654的杂交瘤细胞株Jnw1D2分泌产生,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址:中国,武汉,武汉大学,保藏编号:CCTCC NO:C201654。

6. 根据权利要求1所述的用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法,其特征在于:所述的配制荧光标记物溶液的溶剂为硼酸盐缓冲溶液;所述荧光标记物的工作浓度为荧光标记物的荧光值是背景值硼酸盐缓冲溶液10倍时对应的浓度,为5nM;

所述与荧光标记物有70%结合时对应的抗体稀释倍数作为甲萘威单克隆抗体的工作浓度,为1 $\mu$ g/mL。

7. 根据权利要求1所述的用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法,其特征在于:所述竞争反应的温度为20-25 $^{\circ}$ C,时间为5-10min。

8. 根据权利要求1所述的用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法,其特征在于:所述荧光偏振值的测定条件为:激发波长为485nm,发射波长为530nm。

9. 根据权利要求1所述的用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法,其特征在于:所述待测样品可为农产品。

10. 根据权利要求9所述的用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法,其特征在于:所述的农产品为草莓;

检测前,将草莓前处理得到待测样品基质溶液,所述的前处理为:将草莓样品捣碎,加

乙腈匀浆,将过滤液收集到含有氯化钠的离心管中,离心收集上清提取液,充分蒸干溶剂,加甲醇溶解样品残渣得到样品基质溶液;

检测样品为草莓时,选择空白草莓样品前处理得到的样品基质溶液配置一系列已知浓度的甲萘威标准品的溶液,进行FPIA实验得到草莓基质标准曲线。

## 一种用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法

### 技术领域

本发明属于免疫分析技术和农药残留检测领域,具体涉及一种用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法。

### 背景技术

甲萘威又称西维因、安甲萘,属氨基甲酸酯类杀虫剂,具有高效、持续期长、选择高等特点,是国内使用量较大的广谱性农药,广泛应用于水果、蔬菜、棉花和茶叶等作物生产中。甲萘威是中等毒性农药,具有触杀及胃毒作用,在水体、土壤、水果、粮食等介质中残留时间长,极易引起农产品中残留超标和安全消费问题,对人的免疫系统、神经中枢和内分泌系统造成损害,威胁农业产业可持续发展。2008年欧盟化学品审查委员会第四次会议中的附件 II 明确提出了禁止甲萘威的使用,认为甲萘威除了吞食和内吸性毒性以外,能引发人体所有脏器肿瘤(其中以消化道癌最为常见),属于第三类致癌物质。GB2763-2014食品安全国家标准食品中农药残留最大限量中明确规定了甲萘威在蔬菜中的最大残留限量(Maximum Residue Limit, MRL)为1ppm,谷物中为0.5-1ppm,茶叶中为1ppm。标准中没有规定甲萘威在水果中的最大残留限量,参考各国对其规定,甲萘威在水果中的MRL为1-5ppm。

目前,甲萘威残留的检测方法主要有高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用法、高效液相色谱-质谱联用法、胆碱酯酶抑制法和免疫分析法。其中高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用法和高效液相色谱-质谱联用法虽然准确度高、重现性好,但是需要依赖于昂贵的仪器设备,分析成本高且对检测环境和操作人员均有较高要求,难以满足现场快速检测需求;胆碱酯酶抑制法具有通用性强、简便快速等优点,一定程度上满足了现场检测需求,但其灵敏度低,难以满足痕量检测需求。

免疫分析技术,因具有灵敏度高、特异性强、成本低、简便快速等优点被越来越广泛地应用于农药残留检测领域。但是常用的酶联免疫吸附法和侧流免疫层析技术需要进行多步分离和洗涤操作,操作较复杂、耗时较长。

### 发明内容

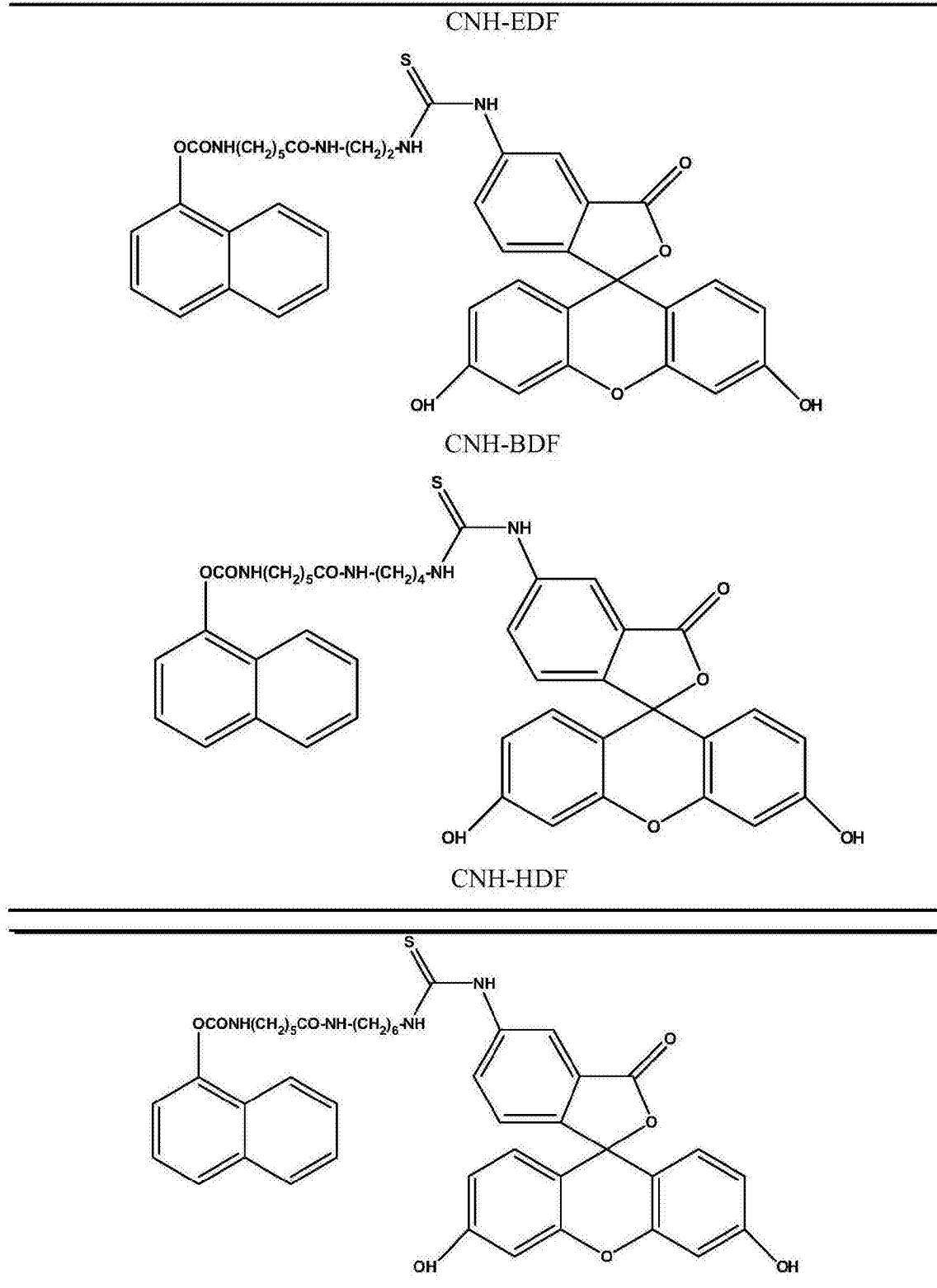
本发明针对现有的甲萘威免疫检测技术中,操作复杂、耗时长等缺点,建立一种用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法,整个检测过程只需要一步竞争反应,操作简单、快速。

本发明所提供的用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法:将待测样品与所述荧光标记物溶液以及甲萘威单克隆抗体溶液混合,孵育进行竞争反应,测定所得体系的荧光偏振值,根据荧光偏振值-甲萘威标准样品中甲萘威浓度标准曲线,计算所述待测样品中甲萘威的浓度。

按上述方案,所述的荧光偏振值-甲萘威标准样品中甲萘威的浓度标准曲线是采用以下方法获得的:将一系列已知浓度的甲萘威标准品的溶液分别与荧光标记物溶液以及甲萘威单克隆抗体溶液混合,孵育进行竞争反应,测定所得体系的荧光偏振值;以测定的荧光偏振值为纵坐标,所述一系列已知浓度的甲萘威标准品的浓度为横坐标,绘制标准曲线。

按上述方案,所述荧光标记物为甲萘威半抗原6-(1-萘氧基甲酰胺基)-己酸(CNH)与荧光素的酰胺偶联物。

按上述方案,所述荧光素选自下述任意一种:异硫氰酸荧光素乙二胺(EDF),异硫氰酸荧光素丁二胺(BDF),异硫氰酸荧光素己二胺(HDF);所述荧光标记物具有表1所示的结构;



按上述方案,所述荧光标记物优选为CNH-EDF。

按上述方案,所述甲萘威单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO:C201654的杂交瘤细胞株Jnw1D2分泌产生,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址:中国,武汉,武汉大学,保藏编号:CCTCC NO:C201654,保藏日期:2016年3月29日。

按上述方案,所述一系列已知浓度的甲萘威标准品的溶液为100 $\mu$ g/mL、10 $\mu$ g/mL、1 $\mu$ g/mL、0.5 $\mu$ g/mL、0.1 $\mu$ g/mL、0.05 $\mu$ g/mL、0.01 $\mu$ g/mL、0.005 $\mu$ g/mL和0.001 $\mu$ g/mL 9个浓度梯度。

按上述方案,所述的配制荧光标记物溶液的溶剂为硼酸盐缓冲溶液;所述荧光标记物的工作浓度为荧光标记物的荧光值是背景值硼酸盐缓冲溶液10倍时对应的浓度,为5nM。

按上述方案,所述与荧光标记物有70%结合时对应的抗体稀释倍数作为甲萘威单克隆抗体的工作浓度,为1 $\mu$ g/mL。

按上述方案,所述待测样品的溶液体积为50 $\mu$ L,所述荧光标记物溶液和所述甲萘威单克隆抗体溶液的体积分别为500 $\mu$ L。

按上述方案,所述竞争反应的温度为20-25 $^{\circ}$ C,优选为25 $^{\circ}$ C,时间为5-10min,优选为10min。

按上述方案,所述荧光偏振值的测定条件为:激发波长为485nm,发射波长为530nm。

按上述方案,所述待测样品可为水果、蔬菜等农产品。具体可为草莓;

检测前,将草莓前处理得到待测样品基质溶液,所述的前处理为:将草莓样品捣碎,加乙腈匀浆,将过滤液收集到含有氯化钠的离心管中,离心收集上清提取液,充分蒸干溶剂,加甲醇溶解样品残渣得到样品基质溶液;

检测样品为草莓时,选择空白草莓样品前处理得到的样品基质溶液配置一系列已知浓度的甲萘威标准品的溶液,进行FPIA实验得到草莓基质标准曲线。

上述方法在农产品中甲萘威含量检测中的应用。

本发明的检测原理:甲萘威单克隆抗体与荧光素标记的甲萘威半抗原特异性结合,使得荧光素的荧光偏振信号值增加。而待测样品存在甲萘威时(或甲萘威标准品存在时),甲萘威与荧光素标记的甲萘威半抗原竞争结合甲萘威单克隆抗体,使得与甲萘威单克隆抗体结合的荧光素标记的甲萘威半抗原减少,且荧光偏振信号值随着待测甲萘威浓度的增加而降低,由此本发明可基于高灵敏高特异性的甲萘威单克隆抗体实现对甲萘威的快速高灵敏定量检测。

本发明的有益效果是:

现有的甲萘威检测技术操作繁琐耗时,不能满足高通量快速检测的要求,而且其他免疫分析方法大多为非均相反应,需要多步孵育和洗涤步骤,耗时长,操作复杂。针对这些不足,本发明提供了一种均相的、快速的甲萘威荧光偏振免疫检测方法(Fluorescence Polarization Immunoassay, FPIA)方法只需要加样,无需分离和洗涤操作,十分钟内就可获得检测结果。本发明建立的甲萘威荧光偏振免疫分析方法在硼酸盐缓冲溶液中标准曲线的灵敏度为82.3ng/mL,检测范围为17.7-383.4ng/mL,在样品中的检测灵敏度为108.6 $\mu$ g/kg,检测范围为32.4-363.6 $\mu$ g/kg;该方法快速、简便高通量,而且能够满足甲萘威的残留检测限量要求,非常适合草莓样品中甲萘威的检测需求。

## 附图说明

图1为硼酸盐缓冲液中甲萘威荧光偏振免疫检测的标准曲线。

图2为草莓样品基质中甲萘威荧光偏振免疫检测的标准曲线。

## 具体实施方式

下面通过具体实施例对本发明进行说明,但本发明并不局限于此。

下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法:下述实施例中所用的试剂、生物材料等,如无特设说明,均可从商业途径得到。

下述实施例中所使用的甲萘威单克隆抗体为杂交瘤细胞株Jnw1D2所分泌的单克隆抗体。具体获得方法:

杂交瘤细胞株Jnw1D2的筛选

### 1. 动物免疫

购买6周龄BALB/c小鼠6只,用6-(1-萘氧基甲酰胺)-己酸(CNH)偶联牛血清白蛋白(BSA),获得甲萘威完全抗原CNH-BSA,免疫小鼠。第一次免疫将甲萘威完全抗原与等体积的弗氏完全佐剂乳化后,于小鼠颈背部皮下多点注射。第二次免疫于3周后进行,采用弗氏不完全佐剂与等体积的甲萘威完全抗原乳化,于小鼠颈背部皮下多点注射。第三次与第四次免疫分别与上一次免疫间隔两周,免疫方式与第二次相同。四次免疫剂量相同,仅为100 $\mu$ g/只。第三次免疫后第7天,小鼠尾静脉采血,分离血清,采用间接ELISA法监测小鼠血清效价,并用间接竞争ELISA法测定小鼠血清灵敏度,选择效价、灵敏度均相对较高的血清对应的小鼠进行加强免疫,免疫剂量为之前量的2倍。

### 2. 细胞融合

于加强免疫3天后,采用50% (重量百分数)的聚乙二醇即PEG (分子量为1450)作融合剂,按常规方法进行细胞融合,具体步骤:无菌条件下脱颈处死待融合小鼠,分离脾细胞,与鼠源骨髓瘤细胞SP2/0以5:1的个数比混合,用RPMI-1640基础培养液洗混合细胞,1200rpm,离心5min。弃去上清,控干,加入1mL PEG,融合1分钟,缓慢加入RPMI-1640基础培养液,离心,弃上清,沉淀即为融合细胞,用20mL HAT完全培养基重悬,将悬起的细胞加入到80mL半固体培养基中,混匀后加到6孔细胞培养板上,2mL/孔,置于37 $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱培养。

所述的含1% HAT的细胞完全培养基含有20% (体积百分数)胎牛血清,75% (体积百分数) RPMI-1640基础培养液,1% (重量百分数) L-谷氨酰胺,1% (体积百分数) HEPES,1% (体积百分数) 双抗 (10000单位每毫升青霉素和10000微克每毫升链霉素),2% (体积百分数) 生长因子 (HFCS) 和1% (重量百分数) 次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷即HAT和甲基纤维素购于sigma-Aldrich公司。

### 3. 细胞株的筛选及克隆

待细胞融合后2-3周,细胞集落长至肉眼可见时,用微量移液器将克隆从培养基中挑出,转移至96孔细胞培养板采用HAT液体培养,待细胞长至2/3孔底时,吸取培养上清进行检测。采用两步筛选法,第一步采用间接ELISA方法,筛选出抗甲萘威而不抗载体蛋白BSA的阳性孔;第二步采用间接竞争ELISA法对第一步筛选出的阳性孔进行检测,用甲萘威作为竞争原,选择吸光值和灵敏度均较高的孔 (吸光值较高指竞争原为0的孔即阳性对照孔的最终测定值较高,灵敏度较高指抑制率为50%时的竞争原浓度亦IC<sub>50</sub>值较小),采用有限稀释法进行亚克隆,亚克隆后采用同样的两步法进行检测,如此重复亚克隆4-5次后,获得杂交瘤细胞株Jnw1D2,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址:中国,武汉,武汉大学,保藏编号:

CCTCC NO:C201654,保藏日期:2016年3月29日。

#### 4. 抗甲萘威单克隆抗体杂交瘤细胞株Jnw1D2抗体可变区序列测定。

(1) 提取总RNA:采用天根公司的总RNA提取试剂盒并按照说明书提取可产生杂交瘤细胞株Jnw1D2的总RNA;

(2) 合成cDNA:以步骤1获得的总RNA为模板,oIigo (dT) 15为引物,按照SuperScript™-2II反转录酶说明书进行反转录,合成cDNA第一链;引物oIigo (dT) 15由Invitrogen购得;

(3) PCR法克隆可变区基因:根据GENEBANK中小鼠抗体基因序列的保守位点设计引物,以cDNA为模板扩增抗体轻、重链可变区基因。PCR程序为:94℃30s、58℃45s、72℃1min,扩增30个循环,最后72℃延伸10min。PCR产物经过1% (重量百分数)的琼脂糖凝胶电泳分离后,用试剂盒纯化回收DNA片段,连接在载体pMD18-T中,转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,挑取阳性克隆,送至上海桑尼生物科技有限公司进行测序。其中引物的序列分别为:重链可变区引物为5'-ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC-3' (21mer)和轻链可变区引物为5'-ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC-3' (21mer)和5'-CAG GGG CCA GTG GAT AGA CAG ATG G-3' (21mer)。

得到的基因序列结果:重链可变区编码基因序列长339bp,序列如SEQ ID NO:1所示,根据所获得的基因序列推导出该基因序列所编码的重链可变区由113个氨基酸组成,序列如SEQ ID NO:3所示。轻链可变区编码基因序列长315bp,序列如SEQ ID NO:2所示,根据所获得的基因序列推导出该基因序列所编码的轻链可变区由105个氨基酸组成,序列如SEQ ID NO:4所示。

#### 5. 抗甲萘威单克隆抗体的制备纯化、亚型和特性鉴定

将获得的抗甲萘威单克隆抗体杂交瘤细胞株Jnw1D2注射预先用弗氏不完全佐剂处理过的BALB/c小鼠,收集该小鼠的腹水,采用辛酸-硫酸铵法纯化抗体,具体操作为:用双层滤纸过滤小鼠腹水,4℃,12000r/min离心15min以上,吸取上清,将所得腹水上清与4倍体积的醋酸盐缓冲液混合,搅拌下缓慢加入正辛酸,每毫升腹水所需的正辛酸体积为30-35 $\mu$ L,室温混合30-60min,4℃静置2h以上。12000r/min,4℃离心30min以上,弃沉淀,将得到的上清液用双层滤纸过滤后,加入1/10滤液体积的摩尔浓度为0.1mol/L和pH为7.4的磷酸盐缓冲液,用2mol/L的氢氧化钠溶液调节该混合液的pH至7.4,冰浴中缓慢加入硫酸铵至硫酸铵浓度为0.277g/mL,4℃静置2h以上,然后12000r/min,4℃离心30min以上,弃上清,将所得沉淀用原腹水体积1/10体积的摩尔浓度为0.01mol/L、pH为7.4的磷酸盐缓冲液重悬,装入透析袋,用0.01mol/LPBS透析两天,再改用PB透析两天,将透析袋中蛋白溶液取出,离心,收集上清,弃沉淀,放入-70℃预冻后放入冻干机中冻干。收集冻干粉,即为纯化好的抗甲萘威单克隆抗体;

所述的醋酸盐缓冲液为0.29g醋酸钠,0.141mL醋酸加水定容到100mL所得;所述的0.01mol/L的磷酸盐缓冲液为0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容到100mL所得;所述的0.1mol/L的磷酸盐缓冲液为8g氯化钠,2.9g十二水磷酸氢二钠,0.2g氯化钾,0.2g磷酸二氢钾,加水定容到100mL所得。

[0042] 用市售亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞株Jnw1D2分泌的抗甲萘威单克隆抗体的亚型为IgG2b。通过酶联免疫吸附法(ELISA)测得抗体的效价可达 $1.6 \times 10^4$ 。对甲萘威的50%抑制浓度IC<sub>50</sub>为0.668ng/kg,与克百威、涕灭威、灭多威等无交叉反应

#### 实例1、荧光标记物的制备

### 步骤1: 甲萘威半抗原合成中间体(1-萘氧基-4-硝基苯碳酸酯)的制备

在1L四口瓶中装上电动搅拌,配置温度计及恒压滴液漏斗,室温加入240mL二氯甲烷,33mL三乙胺,31.7g甲萘酚,搅拌溶解后,用低温反应浴降至0℃;将40.2g对硝基氯甲酸苯酯溶于60mL二氯甲烷溶液中,慢慢滴加到上述溶液中,产生白烟,溶液的颜色变化随着滴加变深,1h滴加完毕后,保温反应3h,TLC监控原料反应完全(展开剂:二氯甲烷:石油醚=1:3);加入360mL 3%的盐酸,搅拌约30min,分液,合并有机相,用300mL水洗涤2次至中性;用无水硫酸钠干燥,减压浓缩至约60mL,加入180mL甲基叔丁基醚,冷却有固体析出,抽滤得到白色固体即为甲萘威半抗原合成中间体。

### 步骤2: 甲萘威半抗原CNH的合成

在1L四口瓶中装上电动搅拌,配置温度计及恒压滴液漏斗,室温加入360mL饱和碳酸氢钠溶液和9.6g 6-氨基己酸,搅拌至固体溶解后,用低温反应浴降温至0℃;将12g中间体(中间体与6-氨基己酸的摩尔比为1:2)溶解在360mL氢呋喃中的溶液,缓慢滴加到上述溶液中,溶液颜色变为黄色,逐渐由固体析出,1h滴加完毕,室温搅拌过夜;抽滤,滤液用3mol/L盐酸调至pH=4~5,用300mL乙酸乙酯分3次萃取,合并有机相;用无水硫酸钠干燥后,减压脱去溶剂,得10g黄色油状物,加入10mL乙酸乙酯和30mL甲基叔丁基醚,进行重结晶,得淡粉色固体。

### 步骤3: 异硫氰酸荧光素乙二胺EDF的合成

称取200mg (1.5mmol) 乙二胺盐酸盐溶解于50mL甲醇和0.5mL三乙胺混合液中,标为A液;称取117mg (0.3mmol) FITC溶于10mL甲醇和100μL三乙胺混合液中,标为B液。将B液在30min内逐滴加入到A液中,室温避光搅拌反应2h后,避光静置反应过夜。用滤纸过滤生成的橙色沉淀,用10mL甲醇洗涤沉淀,室温避光放置自然干燥,即为EDF。荧光素BDF和HDF的合成方法与之类似。

### 步骤4: 荧光标记物的合成

以CNH-EDF为例,合成方法如下:

称取4mg DCC和2mg NHS至500μL DMF中,混合均匀后加入3mg甲萘威半抗原CNH,室温振荡反应12h。接着加入2mg EDF至上述活化的CNH中,继续室温避光反应4h。取50μL反应液用薄层色谱法(TLC)分离,展开剂为:三氯甲烷/甲醇(v:v,4:1)。刮取硅胶板上 $R_f=0.9$ 的黄色条带,甲醇洗脱,检测备用。经质谱鉴定,CNH-EDF产物峰 $m/z$ 为733.23  $[M+H]^+$ 。

其他荧光标记物CNH-BDF和CNH-HDF的反应步骤与EDF的标记方法类似,荧光标记物置于4℃保存。

### 实例2、最佳荧光标记物的筛选

步骤一:首先将各荧光标记物的工作浓度均设定为荧光强度为硼酸盐缓冲溶液背景荧光强度的10倍时对应的荧光标记物的浓度(5nM),将抗体用硼酸盐缓冲溶液按照1/125、1/250、1/500、1/1000、1/2000、1/4000、1/8000、1/16000和1/32000稀释,绘制抗体结合曲线,获得信号强度变化的最大值 $\delta mP$  ( $\delta mP = mP_{max} - mP_{min}$ ),其中CNH-EDF的信号变化值最大。实验结果如表2所示:

表2三种荧光标记物与抗体结合的信号强度

荧光标记物	$\delta$ mP
CNH-EDF	231
CNH-BDF	124
CNH-HDF	102

步骤二: 首先将各荧光标记物的工作浓度均设定为荧光强度为BB缓冲溶液(硼酸盐缓冲溶液)背景荧光强度的10倍时对应的荧光标记物的浓度(5nM), 在与荧光标记物有70%结合时的抗体稀释度(1 $\mu$ g/mL)条件下, 建立不同标记物的甲萘威检测标准曲线并计算IC<sub>50</sub>, 根据各标准曲线的IC<sub>50</sub>值选出最佳荧光标记物。实验结果如表3所示。

表3

荧光标记物	IC <sub>50</sub> (ng/mL)
CNH-EDF	88.5
CNH-BDF	150.5
CNH-HDF	170.8

由表3可知, 最佳的荧光标记物为CNH-EDF。

#### 实例3、FPIA方法的建立

步骤一: 竞争FPIA; 硼酸盐缓冲液配制: 称取0.47mg Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 0.05mg NaN<sub>3</sub>溶解于0.5mL高纯水中, pH值为8.5。

利用含10%甲醇的硼酸盐缓冲液分别配置100 $\mu$ g/mL、10 $\mu$ g/mL、1 $\mu$ g/mL、0.5 $\mu$ g/mL、0.1 $\mu$ g/mL、0.05 $\mu$ g/mL、0.01 $\mu$ g/mL、0.005 $\mu$ g/mL和0.001 $\mu$ g/mL 9个浓度梯度的甲萘威标准品, 在反应试管中分别加入50 $\mu$ L甲萘威标准品、500 $\mu$ L工作浓度(5nM)的荧光标记物以及500 $\mu$ L工作浓度(1 $\mu$ g/mL)的甲萘威单克隆抗体溶液, 室温避光孵育10min后测定荧光偏振值; 测定条件为激发波长485nm, 发射波长530nm, cutoff值515nm。

步骤二: 绘制标准曲线: 竞争反应结束后, 以测定的荧光偏振值为纵坐标, 甲萘威标准品的浓度为横坐标, 利用Origin 9.0的四参数模型拟合标准曲线。

硼酸盐缓冲溶液中的甲萘威荧光偏振标准曲线见附图1。

所建立的标准曲线的灵敏度为82.3ng/mL, 检测范围为17.7-383.4ng/mL。

#### 实例4、样品检测应用例

步骤一: 称取捣碎后的草莓空白样品(经液相色谱法检测确定不含甲萘威)20.0g, 加入20.0mL乙腈中, 高速匀浆2min后, 过滤到装有4g氯化钠的50mL离心管中, 剧烈震荡3min, 5000g离心2min, 吸取上清提取液10mL到烧杯中, 80 $^{\circ}$ C水浴加热, 杯内通入氮气, 蒸发至近干, 加入10mL甲醇溶解样品残渣即得样品基质溶液。用样品基质溶液分别配置100 $\mu$ g/mL、10 $\mu$ g/mL、1 $\mu$ g/mL、0.5 $\mu$ g/mL、0.1 $\mu$ g/mL、0.05 $\mu$ g/mL、0.01 $\mu$ g/mL、0.005 $\mu$ g/mL和0.001 $\mu$ g/mL 9个浓度梯度的甲萘威标准品。依次加入50 $\mu$ L甲萘威基质加标溶液, 500 $\mu$ L荧光标记物溶液和500 $\mu$ L甲萘威单克隆抗体溶液, 25 $^{\circ}$ C孵育5min后进行FPIA检测。根据荧光偏振信号与甲萘威标准品浓度之间的相关性即得到草莓样品中甲萘威检测的标准曲线也就是图2。草莓基质

中甲萘威的检测灵敏度为108.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,检测范围为32.4-363.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;国际标准中规定水果中甲萘威最高残留限量为1 $\text{mg}/\text{kg}$ ,因此本发明的方法能够很好的满足检测灵敏度的需要。

步骤二:添加回收率测定;草莓空白基质中加入甲萘威标准品,使其终浓度为50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,每个浓度三个平行,按照上述样品处理方法处理并检测,按照如下公式计算添加回收率。

$$\text{添加回收率}(\%) = (\text{测定值}/\text{添加值}) \times 100\%$$

利用计算获得的检测回收率来评价本发明所建立的甲萘威荧光偏振免疫检测方法的准确度;实验结果见表4所示:

表4草莓中添加回收结果(n=3)

添加值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回收 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回收率 (%)	CV (%)
50	49.2	98.4	3.9
100	105.6	105.6	5.6
200	180.5	90.2	6.7

由表4可见,甲萘威在草莓中的平均添加回收率在90.2-105.6%之间,变异系数(CV)小于6.7%;表明本发明建立的甲萘威荧光偏振免疫检测方法可满足草莓中甲萘威的残留检测要求;而且本发明快速高效、反应灵敏,解决了传统免疫方法操作复杂、耗时长的缺点,能够很好地用于甲萘威的快速、高灵敏检测。

## 序列表

<110> 中国农业科学院油料作物研究所

<120> 一种用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法

<160> 4

<210> 1

<211> 339bp

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 1

```
cagggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag 50
cctgtccatc acttgcaactg tctctgggct ttcattaacc agctatgggtg 100
tacactgggt tcgtcaggcc ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagta 150
at ttgggggtg gtggaaacac aaattataat tcggetetca tgtccagact 200
gagcatcagc aaagacaact ccaggagcca agttttetta agaatgaaca 250
gtctgcaaat tgatgacaca gccatgtact attgtgccag aggcaggatg 300
gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc gtctctgca 339
```

<210> 1

<211> 315bp

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 2

```
gacatcaaga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga 50
aagagtcact atcacttgca aggcgagtca ggacattagt agctatttag 100
gctggttaca gcagaaacca gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt 150
gcaaacacat tggtagaagg ggtcccatcc agattcagtg gcagtggatc 200
tggggaagat tattctctca ccatcagcag cctggagtat gaagatatgg 250
gaatttatta ttgtctacag tatgatgagt ttccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggaa 315
```

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

```
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile
1           5           10           15           20
Thr Cys Thr Val Ser Gly Leu Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala
           25           30           35           40
Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Asn
           45           50           55           60
```

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Arg Ser Gln Val Phe Leu			
	65	70	75
Arg Met Asn Ser Leu Gln Ile Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Met			
81	85	90	95
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
	105	110	113
<210> 1			
<211> 105			
<212> PRT			
<213> 小鼠			
<400> 4			
Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr			
1	5	10	15
Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Gly Thr Leu Gln Gln Lys Pro			
	25	30	35
Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Arg Ala Asn Thr Leu Val Glu Gly Val Pro Ser			
	45	50	55
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Glu Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Thr			
	65	70	75
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly			
	85	90	95
Gly Thr Lys Leu Glu			
	105		

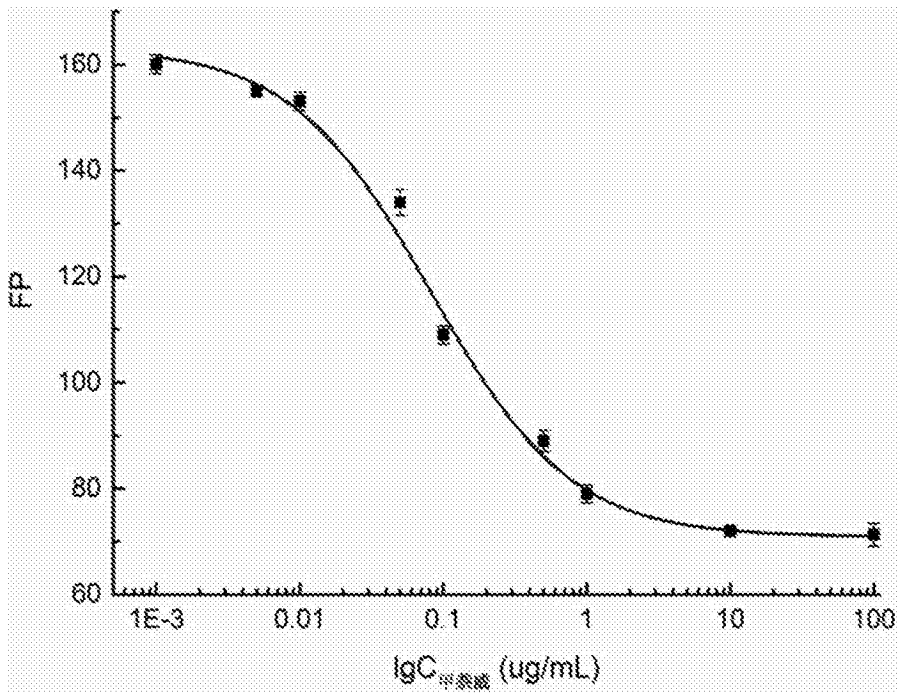


图1

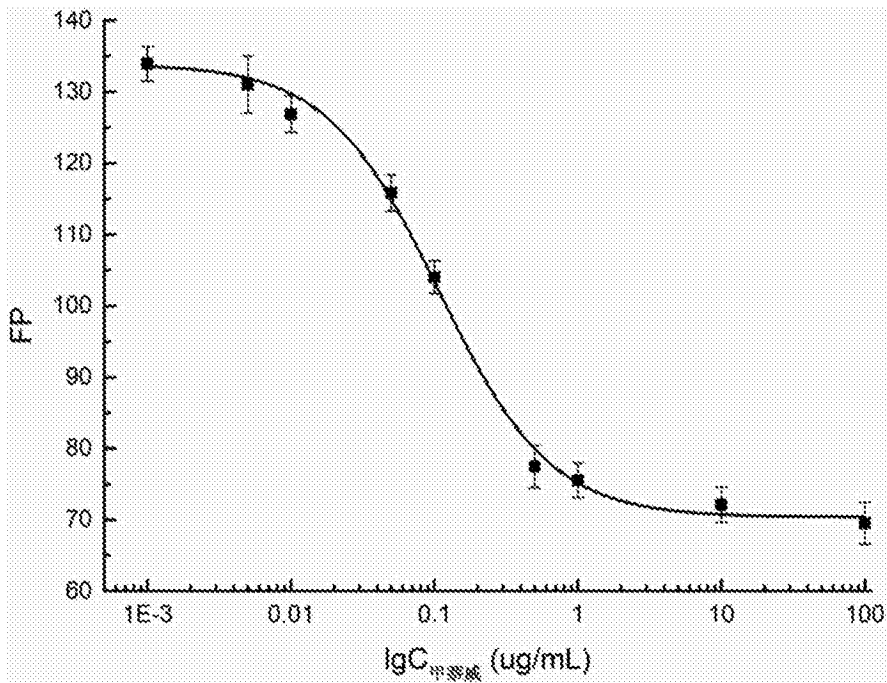


图2

专利名称(译)	一种用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106872706A</a>	公开(公告)日	2017-06-20
申请号	CN201710061067.X	申请日	2017-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
[标]发明人	李培武 李慧 杨青青 唐晓倩 张奇 张文 张兆威 丁小霞		
发明人	李培武 李慧 杨青青 唐晓倩 张奇 张文 张兆威 丁小霞		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N21/6445 G01N33/542 G01N33/582 G01N2021/6439 G01N33/577		
代理人(译)	乔宇		
其他公开文献	CN106872706B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测甲萘威的荧光偏振免疫分析方法。该方法为：将待测样品与所述荧光标记物溶液以及甲萘威单克隆抗体溶液混合，孵育进行竞争反应，测定所得体系的荧光偏振值，根据荧光偏振值-甲萘威标准样品中甲萘威浓度标准曲线，计算所述待测样品中甲萘威的浓度。本发明提供的甲萘威荧光偏振免疫检测方法(Fluorescence Polarization Immunoassay, FPIA)方法只需要加样，无需分离和洗涤操作，十分钟內就可获得检测结果。能够满足甲萘威的残留检测限量要求。

