



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106932566 A

(43)申请公布日 2017.07.07

(21)申请号 201710250425.1

(22)申请日 2017.04.17

(71)申请人 四川精卫食品检测科技有限公司
地址 620000 四川省眉山市经济开发区东
区创业路1号

(72)发明人 石洁 郭艳琴 何艳平 蒲小容
徐毓琴

(74)专利代理机构 成都睿道专利代理事务所
(普通合伙) 51217

代理人 赵云

(51) Int. Cl.
G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页

(54)发明名称

一种多菌灵和甲基硫菌灵二合一检测酶联
免疫试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种多菌灵和甲基硫菌灵二合一检测酶联免疫试剂盒,试剂盒包括酶标板、酶标记物工作液、多菌灵和甲基硫菌灵特异性抗体浓缩液、洗涤工作液、复溶工作液和TMB显色液,其中,所述酶标板的微孔条上预包被多菌灵和甲基硫菌灵偶联抗原,所述酶标记物工作液为酶标记抗体工作液。本发明多菌灵和甲基硫菌灵二合一检测酶联免疫试剂盒,是应用ELISA技术研发的新一代药物残留检测产品,与传统仪器分析技术相比,具有检测快速、简便、准确,低成本以及检测灵敏度高等特点,能最大限度地减少操作误差和工作强度。

1. 一种多菌灵和甲基硫菌灵二合一检测酶联免疫试剂盒,其特征在于:试剂盒包括酶标板、酶标记物工作液、多菌灵和甲基硫菌灵特异性抗体浓缩液、洗涤工作液、复溶工作液和TMB显色液,其中,所述酶标板的微孔条上预包被多菌灵和甲基硫菌灵偶联抗原,所述酶标记物工作液为酶标记抗抗体工作液,具体如下:

(1) 洗涤工作液,浓缩洗涤液1:19体积比稀释而成,所述浓缩洗涤液为pH值为7.1~7.5,含有0.8%~1.2%吐温-20、0.01%~0.03%硫柳汞防腐剂、0.01~0.03mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;

(2) 复溶工作液,浓缩复溶液1:1体积比稀释而成,pH值为7.2~7.7,含有8%~12%卵清蛋白、0.1~0.4mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;

(3) TMB显色液,包括TMB底物液A液和TMB底物液B液,A液为过氧化氢,B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺;

(4) 终止液,0.5mol/L的盐酸缓冲液;

(5) 酶标板为96孔酶标板,其中在酶标板制备过程中所用的包被缓冲液为pH值为9.6,0.05mol/L的碳酸盐缓冲液,所用封闭液为pH值为9.1~9.5,含有3%~10%小牛血清、0.2%吐温-20、0.1~0.3mol/L的碳酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;酶标板的制备过程为,用包被缓冲液将包被原稀释成0.1~0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$,每孔加入100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育2h或4 $^{\circ}\text{C}$ 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 μl 封闭液37 $^{\circ}\text{C}$ 温育1~2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空;

(6) 其中,本发明多菌灵和甲基硫菌灵特异性抗体的制备流程为:将这两种抗原注入到小鼠进行免疫反应,最终得到两种针对不同多菌灵和甲基硫菌灵结构的抗体;

(7) 酶标二抗工作液,本实施例酶标二抗采用羊抗鼠抗抗体,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;

(8) 多菌灵和甲基硫菌灵标准溶液,浓度分别为0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、9 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、27 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和81 $\mu\text{g}/\text{L}$;其中标准品稀释液为PH值7.4的0.02mol/L磷酸盐缓冲液。

2. 根据权利要求1所述的多菌灵和甲基硫菌灵二合一检测酶联免疫试剂盒,其特征在于:多菌灵半抗原小分子改造路线为:称取0.5g-2g多菌灵溶于经干燥后的四氢呋喃中,通氮气保护,加入0.24g马来酸酐常温搅拌溶解,加入10-50mgDMAP(4-二甲氨基吡啶)体进行催化反应,70 $^{\circ}\text{C}$ 回流反应,用TLC薄层板监测反应进行,直至没有原料或原料点很浅,停止反应,硅胶柱净化,浓缩得产物;产率>85%。

3. 根据权利要求1所述的多菌灵和甲基硫菌灵二合一检测酶联免疫试剂盒,其特征在于:免疫抗原制备方法为:称取29.1mg半抗原溶解于2mLDMF(N,N-二甲基甲酰胺溶液)溶液中,加入各60mgEDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和60mgNHS(N-羟基丁二酰亚胺)溶于2mL水中进行活化30分钟,加入到132-440mg载体蛋白BSA(牛血清白蛋白)溶于5mL水溶液中,调溶液PH8-9,室温进行偶联制备出免疫原,用0.01mol/LPB缓冲液透析3天,每天早晚更换透析液,透析完成后用于动物免疫制备出抗体;同样的方法将半抗原与载体蛋白OVA进行偶联制出包被原。

4. 根据权利要求1所述的多菌灵和甲基硫菌灵二合一检测酶联免疫试剂盒,其特征在于:包被抗原制备方法为:称取29.1mg半抗原溶解于2mLDMF(N,N-二甲基甲酰胺溶液)溶液中,加入各60mgEDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和60mgNHS(N-羟基丁二

酰亚胺)溶于2mL水中进行活化30分钟,加入到90-300mg载体蛋白OVA(卵清蛋白)溶于5mL水溶液中,调溶液PH8-9,室温进行偶联制备出免疫原,用0.02mol/LPB缓冲液透析3天,每天早晚更换透析液,制得包被原。

一种多菌灵和甲基硫菌灵二合一检测酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种多菌灵和甲基硫菌灵二合一检测酶联免疫试剂盒,属于生物工程技术领域。

背景技术

[0002] 针对多菌灵和甲基硫菌灵的检测方式,现有国标等相关检测方法为气相、液相或气质连用等方法,该类方法仪器设备采购成本高,人员要求高、试剂耗材昂贵、检测周期长。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种多菌灵和甲基硫菌灵二合一检测酶联免疫试剂盒,以便更好地改善测试效果。

[0004] 为了实现上述目的,本发明的技术方案如下。

[0005] 一种多菌灵和甲基硫菌灵二合一检测酶联免疫试剂盒,试剂盒包括酶标板、酶标记物工作液、多菌灵和甲基硫菌灵特异性抗体浓缩液、洗涤工作液、复溶工作液和TMB显色液,其中,所述酶标板的微孔条上预包被多菌灵和甲基硫菌灵偶联抗原,所述酶标记物工作液为酶标记抗体工作液,具体如下:

[0006] (1) 洗涤工作液,浓缩洗涤液1:19体积比稀释而成,所述浓缩洗涤液为pH值为7.1~7.5,含有0.8%~1.2%吐温-20、0.01%~0.03%硫柳汞防腐剂、0.01~0.03mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;

[0007] (2) 复溶工作液,浓缩复溶液1:1体积比稀释而成,pH值为7.2~7.7,含有8%~12%卵清蛋白、0.1~0.4mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;

[0008] (3) TMB显色液,包括TMB底物液A液和TMB底物液B液,A液为过氧化氢,B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺;

[0009] (4) 终止液,0.5mol/L的盐酸缓冲液;

[0010] (5) 酶标板为96孔酶标板,其中在酶标板制备过程中所用的包被缓冲液为pH值为9.6,0.05mol/L的碳酸盐缓冲液,所用封闭液为pH值为9.1~9.5,含有3%~10%小牛血清、0.2%吐温-20、0.1~0.3mol/L的碳酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;酶标板的制备过程为,用包被缓冲液将包被原稀释成0.1~0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$,每孔加入100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育2h或4 $^{\circ}\text{C}$ 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 μl 封闭液37 $^{\circ}\text{C}$ 温育1~2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空;

[0011] (6) 其中,本发明多菌灵和甲基硫菌灵特异性抗体的制备流程为:将这两种抗原注入到小鼠进行免疫反应,最终得到两种针对不同多菌灵和甲基硫菌灵结构的抗体。

[0012] (7) 酶标二抗工作液,本实施例酶标二抗采用羊抗鼠抗抗体,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。

[0013] (8) 多菌灵和甲基硫菌灵标准溶液,浓度分别为0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、9 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、27 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和81 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。其中标准品稀释液为PH值7.4的0.02mol/L磷酸盐缓冲液。

[0014] 进一步地,多菌灵半抗原小分子改造路线为:称取0.5g-2g多菌灵溶于经干燥后的四氢呋喃中,通氮气保护,加入0.24g马来酸酐常温搅拌溶解,加入10-50mgDMAP(4-二甲氨基吡啶)体进行催化反应,70℃回流反应,用TLC薄层板监测反应进行,直至没有原料或原料点很浅,停止反应,硅胶柱净化,浓缩得产物。产率>85%。

[0015] 进一步地,免疫抗原制备方法为:称取29.1mg半抗原溶解于2mLDMF(N,N-二甲基甲酰胺溶液)溶液中,加入各60mgEDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和60mgNHS(N-羟基丁二酰亚胺)溶于2mL水中进行活化30分钟,加入到132-440mg载体蛋白BSA(牛血清白蛋白)溶于5mL水溶液中,调溶液PH8-9,室温进行偶联制备出免疫原,用0.01mol/LPB缓冲液透析3天,每天早晚更换透析液,透析完成后用于动物免疫制备出抗体。同样的方法将半抗原与载体蛋白OVA进行偶联制出包被原。

[0016] 进一步地,包被抗原制备方法为:称取29.1mg半抗原溶解于2mLDMF(N,N-二甲基甲酰胺溶液)溶液中,加入各60mgEDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和60mgNHS(N-羟基丁二酰亚胺)溶于2mL水中进行活化30分钟,加入到90-300mg载体蛋白OVA(卵清蛋白)溶于5mL水溶液中,调溶液PH8-9,室温进行偶联制备出免疫原,用0.02mol/LPB缓冲液透析3天,每天早晚更换透析液,制得包被原。

[0017] 该发明的有益效果在于:本发明多菌灵和甲基硫菌灵二合一检测酶联免疫试剂盒,是应用ELISA技术研发的新一代药物残留检测产品,与传统仪器分析技术相比,具有检测快速、简便、准确,低成本以及检测灵敏度高等特点,能最大限度地减少操作误差和工作强度。

具体实施方式

[0018] 下面结合实施例对本发明的具体实施方式进行描述,以便更好的理解本发明。

[0019] 实施例

[0020] 本实施例中的多菌灵和甲基硫菌灵二合一检测酶联免疫试剂盒,包括酶标板、酶标记物工作液、多菌灵和甲基硫菌灵特异性抗体浓缩液、洗涤工作液、复溶工作液和TMB显色液,其中,所述酶标板的微孔条上预包被多菌灵和甲基硫菌灵偶联抗原,所述酶标记物工作液为酶标记抗体工作液。其中:

[0021] (1) 洗涤工作液,浓缩洗涤液1:19体积比稀释而成,所述浓缩洗涤液为pH值为7.1~7.5,含有0.8%~1.2%吐温-20、0.01%~0.03%硫柳汞防腐剂、0.01~0.03mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;

[0022] (2) 复溶工作液,浓缩复溶液1:1体积比稀释而成,pH值为7.2~7.7,含有8%~12%卵清蛋白、0.1~0.4mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;

[0023] (3) TMB显色液,包括TMB底物液A液和TMB底物液B液,A液为过氧化氢,B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺;(4) 终止液,0.5mol/L的盐酸缓冲液;

[0024] (5) 酶标板为96孔酶标板,其中在酶标板制备过程中所用的包被缓冲液为pH值为9.6,0.05mol/L的碳酸盐缓冲液,所用封闭液为pH值为9.1~9.5,含有3%~10%小牛血清、0.2%吐温-20、0.1~0.3mol/L的碳酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;酶标板的制备过程为,用包被缓冲液将包被原稀释成0.1~0.2μg/ml,每孔加入100μl,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150~200μl封

闭液37℃温育1~2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空;

[0025] 多菌灵半抗原小分子改造路线:称取0.5g-2g多菌灵溶于经干燥后的四氢呋喃中,通氮气保护,加入0.24g马来酸酐常温搅拌溶解,加入10-50mgDMAP(4-二甲氨基吡啶)体进行催化反应,70℃回流反应,用TLC薄层板监测反应进行,直至没有原料或原料点很浅,停止反应,硅胶柱净化,浓缩得产物。产率>85%。

[0026] 免疫抗原制备:称取29.1mg半抗原溶解于2mLDMF(N,N-二甲基甲酰胺溶液)溶液中,加入各60mgEDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和60mgNHS(N-羟基丁二酰亚胺)溶于2mL水中进行活化30分钟,加入到132-440mg载体蛋白BSA(牛血清白蛋白)溶于5mL水溶液中,调溶液PH8-9,室温进行偶联制备出免疫原,用0.01mol/LPB缓冲液透析3天,每天早晚更换透析液,透析完成后用于动物免疫制备出抗体。同样的方法将半抗原与载体蛋白OVA进行偶联制出包被原。

[0027] 包被抗原制备:称取29.1mg半抗原溶解于2mLDMF(N,N-二甲基甲酰胺溶液)溶液中,加入各60mgEDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和60mgNHS(N-羟基丁二酰亚胺)溶于2mL水中进行活化30分钟,加入到90-300mg载体蛋白OVA(卵清蛋白)溶于5mL水溶液中,调溶液PH8-9,室温进行偶联制备出免疫原,用0.02mol/LPB缓冲液透析3天,每天早晚更换透析液,制得包被原。

[0028] (6)其中,本发明多菌灵和甲基硫菌灵特异性抗体的制备流程为:将这两种抗原注入到小鼠进行免疫反应,最终得到两种针对不同多菌灵和甲基硫菌灵结构的抗体。

[0029] (7)酶标二抗工作液,本实施例酶标二抗采用羊抗鼠抗抗体,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。本实施例为酶标记的鼠抗抗体,本实施例的标记酶为辣根过氧化物酶,标记酶酶标记的羊抗鼠抗抗体是采用戊二醛法将标记酶与抗抗体进行偶联得到;酶标二抗通过稀释,酶标二抗得到工作液,稀释处理同现有技术;

[0030] (8)多菌灵和甲基硫菌灵标准溶液,浓度分别为0μg/L、1μg/L、3μg/L、9μg/L、27μg/L和81μg/L。其中标准品稀释液为PH值7.4的0.02mol/L磷酸盐缓冲液。

[0031] 针对产品进行测试,具体结果如下:

[0032] (1)检测限测试

[0033] 表1产品检测限测定

[0034]

样本	添加 值	实测值 (μg/g)					平均值
白菜	0.200	0.18	0.21	0.20	0.22	0.21	0.204
苹果	0.200	0.22	0.17	0.19	0.18	0.19	0.19
烟叶	0.200	0.19	0.20	0.20	0.21	0.18	0.195

[0035] (2)精密度测试:

[0036] 表2蔬菜样本精密度测定(添加0.5μg/g)

[0037]

批次	实测值 (μg/g)					变异系数 CV%
1	0.5	0.48	0.52	0.46	0.45	2.5%
2	0.51	0.53	0.5	0.46	0.49	2.3%
3	0.47	0.49	0.47	0.51	0.5	1.6%

[0038] (3) 准确率测试:

[0039] 表3蔬菜样本准确度测定(添加3μg/g)

[0040]

样品	添加回收率测定 (%)			平均值 (%)
样品 1	95%	91%	89%	92%
样品 2	87%	94%	95%	95%
样品 3	103%	105%	88%	98%
样品 4	93%	97%	110%	100%
样品 5	96%	84%	89%	89%

[0041]

平均值	94%	105%	101%	100%
-----	-----	------	------	------

[0042] (4) 特异性测试(交叉反应率):

[0043] 交叉反应率试验:选择其他类农药药物测定交叉反应率,通过各种药物的标准曲线分别得到其50%抑制浓度(即1C50),交叉反应率(%) = (多菌灵1C50/其他类农药1C50) × 100%,结果见表4。

[0044] 表4交叉反应率测定

[0045]

药物名称	交叉反应率 (%)
多菌灵	100%
甲基硫菌灵	86%
百菌清	小于1%
吡虫啉	小于1%
克百威	小于1%

[0046] (5) 产品稳定性测试:

[0047] 试剂盒保存性试验: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、多菌灵添加实际测定值均在正常范围之内。结果见表5。

[0048] 表5试剂产品稳定性保存记录表

[0049]

日期/参数	0 标 OD 值	50% 抑制浓度	第二标准抑制率	线性	添加回收 (3 μ g/g)
保存前	2.012	6	70%	0.999	3.1
第一个月	1.987	7	73%	0.991	2.8
第三个月	1.945	7	82%	0.994	2.9
第六个月	1.854	6	75%	0.992	3.3
第九个月	1.857	6	74%	0.993	3.5
第十二个月	1.798	7	72%	0.998	3.2

[0050] 以上所述是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也视为本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种多菌灵和甲基硫菌灵二合一检测酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN106932566A	公开(公告)日	2017-07-07
申请号	CN201710250425.1	申请日	2017-04-17
[标]发明人	石洁 郭艳琴 何艳平 蒲小容 徐毓琴		
发明人	石洁 郭艳琴 何艳平 蒲小容 徐毓琴		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	赵云		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种多菌灵和甲基硫菌灵二合一检测酶联免疫试剂盒，试剂盒包括酶标板、酶标记物工作液、多菌灵和甲基硫菌灵特异性抗体浓缩液、洗涤工作液、复溶工作液和TMB显色液，其中，所述酶标板的微孔条上预包被多菌灵和甲基硫菌灵偶联抗原，所述酶标记物工作液为酶标记抗体工作液。本发明多菌灵和甲基硫菌灵二合一检测酶联免疫试剂盒，是应用ELISA技术研发的新一代药物残留检测产品，与传统仪器分析技术相比，具有检测快速、简便、准确，低成本以及检测灵敏度高等特点，能最大限度地减少操作误差和工作强度。

样本	添加值	实测值 (µg/g)					平均值
白菜	0.200	0.18	0.21	0.20	0.22	0.21	0.204
苹果	0.200	0.22	0.17	0.19	0.18	0.19	0.19
烟叶	0.200	0.19	0.20	0.20	0.21	0.18	0.195