



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106841598 B

(45)授权公告日 2019.02.19

(21)申请号 201710249637.8

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2017.04.17

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 2847296 Y,2006.12.13,

申请公布号 CN 106841598 A

JP 2005035893 A,2005.02.10,

(43)申请公布日 2017.06.13

EP 0340198 A1,1989.11.02,

(73)专利权人 四川精卫食品检测科技有限公司

惠小敏.土壤中乙草胺残留的间接竞争

地址 620000 四川省眉山市经济开发区东

ELISA检测方法研究.《化学与生物工程》.2008,

区创业路1号

第25卷(第9期),

(72)发明人 何艳平 徐毓琴 蒲小容 石洁

梅平等.乙草胺人工抗原的合成及其单克隆

郭艳琴

抗体的制备.《农药学学报》.2008,第10卷(第1

(74)专利代理机构 成都睿道专利代理事务所

余鹏敏等.乙草胺的酶联免疫吸附分析技

(普通合伙) 51217

术.《江苏农业学报》.2011,第27卷(第2期),

代理人 赵云

审查员 陈伟潘

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页

(54)发明名称

一种乙草胺检测酶联免疫试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种乙草胺检测酶联免疫试剂盒,包括酶标板、酶标记物工作液、乙草胺特异性抗体浓缩液、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乙草胺偶联抗原,所述酶标记物工作液为酶标记抗体工作液。本发明乙草胺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. 一种乙草胺检测酶联免疫试剂盒,其特征在于:包括酶标板、酶标记物工作液、乙草胺特异性抗体浓缩液、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乙草胺偶联抗原,所述酶标记物工作液为酶标记抗体工作液,具体为:

(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 μ g/ml,每孔加入100 μ l,37 $^{\circ}$ C温育2h或4 $^{\circ}$ 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 μ l封闭液37 $^{\circ}$ C温育1~2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空;

(6) 其中,乙草胺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乙草胺结构的抗体;

乙草胺抗原1的合成方法是:乙草胺溶于甲氢呋喃中,氮气保护下加热搅拌加入巯基丙酸,K₂CO₃做催化剂,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,净化,甲醇重结晶,得水解产物;

称取30mg半抗原溶解于2mLDMF溶液中,加入各溶于2mL水中的60mgEDC和NHS进行活化30分钟,加入到溶于5mL水中的110-264mg载体蛋白BSA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,透析完成后用于动物免疫制备出抗体;

乙草胺抗原2的合成方法是:将1.5g乙草胺加入到浓硫酸与浓硝酸的混酸中,浓硫酸与浓硝酸体积比为v/v=30/70,室温下搅拌反应,反应完全后,加入氢氧化钠调pH至中性,抽滤水洗,干燥得反应产物1.45g,将产物溶于甲醇中,通入氢气,加入0.1钼-碳催化反应,反应完成后抽滤浓缩得产物1.3g,产物1.3g溶于干燥四氢呋喃溶液中,加入0.5g丁二酸酐,0.1gDMAP(4-二甲氨基吡啶)作催化剂进行反应,反应完成后,提纯最终得半抗原;称取上半抗原0.1g,分别溶解于3mLN,N-二甲基甲酰胺溶液,分别加入NHS(N-羟基丁二酰亚胺)/EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)混合水溶液,活化4小时;活化后溶液分别加入到含有BSA(牛血清白蛋白)220mg的BSA溶液中,调pH8.5,室温反应24小时,转到透析袋中于0.02mol/L磷酸盐缓冲液溶液中透析3天,每天早晚换液;

上述得到的两种抗原,将如下两种抗原注入到小鼠/兔子进行免疫反应,最终得到两种针对不同乙草胺结构的抗体;

(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;酶标二抗通过稀释,酶标二抗得到工作液;

(8) 乙草胺标准溶液, 浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.5\mu\text{g/L}$ 、 $1.5\mu\text{g/L}$ 、 $4.5\mu\text{g/L}$ 、 $13.5\mu\text{g/L}$ 和 $40.5\mu\text{g/L}$;其中标准品稀释液为PH值7.4的 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液。

一种乙草胺检测酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种乙草胺检测酶联免疫试剂盒,属于生物工程技术领域。

背景技术

[0002] 针对乙草胺的检测中,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乙草胺检测酶联免疫试剂盒,以便更好地针对乙草胺进行检测。

[0004] 为了实现上述目的,本发明的技术方案如下。

[0005] 一种乙草胺检测酶联免疫试剂盒,包括酶标板、酶标记物工作液、乙草胺特异性抗体浓缩液、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乙草胺偶联抗原,所述酶标记物工作液为酶标记抗抗体工作液,具体为:

[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;本发明中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 μ g/ml,每孔加入100 μ l,37 $^{\circ}$ C温育2h或4 $^{\circ}$ 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 μ l封闭液37 $^{\circ}$ 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,本发明乙草胺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乙草胺结构的抗体。

[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;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;

[0013] (8) 乙草胺标准溶液,浓度分别为0 μ g/L、0.5 μ g/L、1.5 μ g/L、4.5 μ g/L、13.5 μ g/L和40.5 μ g/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,乙草胺抗原合成路线为:乙草胺溶于甲氢咪喃中,氮气保护下加热搅拌

加入巯基丙酸, K₂CO₃做催化剂, 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, 净化, 甲醇重结晶, 得水解产物。

[0015] 进一步地, 抗原制备步骤为: 称取30mg半抗原溶解于2mLDMF溶液中, 加入各60mgEDC和NHS溶于2mL水中进行活化30分钟, 加入到110-264mg载体蛋白BSA溶于5mL水中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, 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用于抗体检测。

[0016] 进一步地, 乙草胺抗原合成方案为: 将1.5g乙草胺加入到浓硫酸与浓硝酸的混酸中, 浓硫酸与浓硝酸体积比 (v/v=30/70), 室温下搅拌反应, 反应完全后, 加入氢氧化钠调PH至中性, 抽滤水洗, 干燥得反应产物1.45g。将产物溶于甲醇中, 通入氢气, 加入0.1钼-碳催化反应, 反应完成后抽滤浓缩得产物1.3g, 产物1.3g溶于干燥四氢呋喃溶液中, 加入0.5g丁二酸酐, 0.1gDMAP (4-二甲氨基吡啶) 作催化剂进行反应, 反应完成后, 提纯最终得半抗原。称取上半抗原0.1g, 分别溶解于3mLN,N-二甲基甲酰胺溶液, 分别加入NHS (N-羟基丁二酰亚胺) /EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐) 混合水溶液, 活化4小时; 活化后溶液分别加入到BSA (牛血清白蛋白) 溶液中 (含BSA (牛血清白蛋白) 220mg), 调PH8.5左右, 室温反应24小时, 转到透析袋中于PB (0.02mol/L磷酸盐缓冲液) 溶液中透析3天, 每天早晚换液。得到的两种抗原, 将这两种抗原注入到小鼠/兔子进行免疫反应, 最终得到两种针对不同乙草胺结构的抗体。

[0017] 该发明的有益效果在于: 本发明乙草胺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] 本实施例中的乙草胺检测酶联免疫试剂盒, 包括酶标板、酶标记物工作液、乙草胺特异性抗体浓缩液、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乙草胺偶联抗原, 所述酶标记物工作液为酶标记抗抗体工作液, 具体为:

[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;

[0024] (4) 终止液, 0.5mol/L的盐酸缓冲液;

[0025] (5) 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; 本发明中

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;

[0026] 乙草胺抗原合成路线:乙草胺溶于甲氢呋喃中,氮气保护下加热搅拌加入巯基丙酸,K₂C₂O₃做催化剂,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,净化,甲醇重结晶,得水解产物。

[0027] 抗原制备方法为:称取30mg半抗原溶解于2mLDMF溶液中,加入各60mgEDC和NHS(溶于2mL水中)进行活化30分钟,加入到110-264mg载体蛋白BSA(溶于5mL水中)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,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用于抗体检测。

[0028] 乙草胺抗原合成方案为:将1.5g乙草胺加入到浓硫酸与浓硝酸的混酸中,浓硫酸与浓硝酸体积比($v/v=30/70$),室温下搅拌反应,反应完全后,加入氢氧化钠调PH至中性,抽滤水洗,干燥得反应产物1.45g。将产物溶于甲醇中,通入氢气,加入0.1钨-碳催化反应,反应完成后抽滤浓缩得产物1.3g,产物1.3g溶于干燥四氢呋喃溶液中,加入0.5g丁二酸酐,0.1gDMAP(4-二甲氨基吡啶)作催化剂进行反应,反应完成后,提纯最终得半抗原。

[0029] 称取上半抗原0.1g,分别溶解于3mLN,N-二甲基甲酰胺溶液,分别加入NHS(N-羧基丁二酰亚胺)/EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)混合水溶液,活化4小时;活化后溶液分别加入到BSA(牛血清白蛋白)溶液中(含BSA(牛血清白蛋白)220mg),调PH8.5左右,室温反应24小时,转到透析袋中于PB(0.02mol/L磷酸盐缓冲液)溶液中透析3天,每天早晚换液。得到的两种抗原,将这两种抗原注入到小鼠/兔子进行免疫反应,最终得到两种针对不同乙草胺结构的抗体。

[0030] (6)其中,本发明乙草胺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乙草胺结构的抗体。

[0031] (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;

[0032] (8)乙草胺标准溶液,浓度分别为0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、1.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、4.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、13.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和40.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。其中标准品稀释液为PH值7.4的0.02mol/L磷酸盐缓冲液。

[0033] 针对上述产品进行以下测试:

[0034] (1)检测限测试:

[0035] 表1产品检测限测定

[0036]

样本	添加 值	实测值 (ng/g)					平均值
白菜	50	48	45	51	51	54	50
苹果	50	52	50	51	54	51	51
烟叶	50	47	51	52	49	51	50

[0037] (2) 精密度测试:

[0038] 表2蔬菜样本精密度测定(添加1 $\mu\text{g/g}$)

[0039]

批次	实测值 ($\mu\text{g/g}$)					变异系数 CV%
1	0.96	0.94	1.02	1.00	0.95	3.1%
2	0.87	1.1	0.95	0.98	1.05	8%
3	0.93	0.99	1.1	1.05	0.85	8.8%

[0040] (3) 准确率测试:

[0041] 表3蔬菜样本准确度测定(添加1 $\mu\text{g/g}$)

[0042]

样品	添加回收率测定 (%)			平均值 (%)
样品 1	93.2%	94.6%	103.2%	97.00%
样品 2	93.7%	91.4%	95.5%	93.53%
样品 3	103.7%	105.5%	108.3%	105.83%
样品 4	91.8%	92.7%	98.3%	94.27%
样品 5	99.6%	104.7%	102.3%	102.20%
平均值	96.40%	97.78%	101.52%	98.57%

[0043] (4) 特异性测试(交叉反应率):

[0044] 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IC₅₀),交叉反应率(%)=(乙草胺IC₅₀/其他类农药IC₅₀) \times 100%,结果见表4。

[0045] 表4交叉反应率测定

[0046]

药物名称	交叉反应率 (%)
乙草胺	100%
甲草胺	小于10%

[0047] (5) 产品稳定性测试:

[0048] 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、乙草胺添加实际测定值均在正常范围之内。结果见表5。

[0049] 表5试剂产品稳定性保存记录表

[0050]

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 (1μg/g)
保存前	1.995	1.6	79%	0.990	1.05
第一个月	1.845	1.9	75%	0.994	0.89
第三个月	1.950	1.5	77%	0.993	0.95
第六个月	1.845	1.7	880%	0.992	1.21
第九个月	1.704	1.5	81%	0.998	0.88
第十二个月	1.645	1.8	78%	0.996	0.93

[0051] 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)	一种乙草胺检测酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN106841598B	公开(公告)日	2019-02-19
申请号	CN201710249637.8	申请日	2017-04-17
[标]发明人	何艳平 徐毓琴 蒲小容 石洁 郭艳琴		
发明人	何艳平 徐毓琴 蒲小容 石洁 郭艳琴		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
代理人(译)	赵云		
其他公开文献	CN106841598A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种乙草胺检测酶联免疫试剂盒，包括酶标板、酶标记物工作液、乙草胺特异性抗体浓缩液、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乙草胺偶联抗原，所述酶标记物工作液为酶标记抗抗体工作液。本发明乙草胺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 (ng/g)					平均值
白菜	50	48	45	51	51	54	50
苹果	50	52	50	51	54	51	51
烟叶	50	47	51	52	49	51	50