



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109061147 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201811104529.2

G01N 33/58(2006.01)

(22)申请日 2018.09.21

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(71)申请人 中国烟草总公司郑州烟草研究院  
地址 450001 河南省郑州市高新区枫杨街2号

申请人 国家烟草质量监督检验中心  
北京勤邦生物技术有限公司

(72)发明人 范子彦 陈黎 何方洋 李旭  
刘惠民 唐纲岭 潘立宁 颜权平  
鲁亚辉

(74)专利代理机构 郑州中民专利代理有限公司  
41110  
代理人 姜振东

(51)Int.Cl.  
G01N 33/558(2006.01)

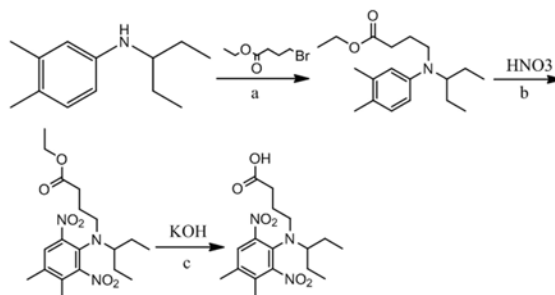
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

## (54)发明名称

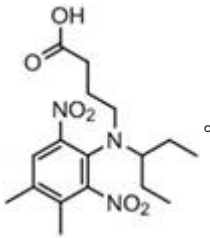
一种检测二甲戊灵的试纸条及其制备方法和应用

## (57)摘要

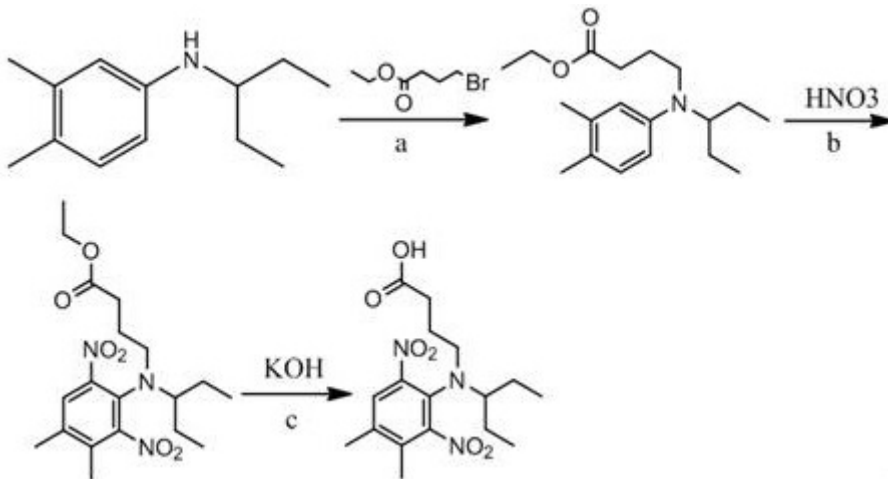
一种检测二甲戊灵的试纸条及其制备方法和应用,该试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板;其特征是:反应膜上具有包被有二甲戊灵半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线,结合物释放垫上喷涂有二甲戊灵单克隆抗体-胶体金标记物。二甲戊灵半抗原是由N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺与4-溴丁酸乙酯反应生成烃基化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,再与浓硝酸反应生成硝基烃化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,然后与KOH反应得到。本发明的优点在于:操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低、不受检测设备限制,可实现对大批量二甲戊灵样品进行快速检测和现场监控。



1. 一种检测二甲戊灵的试纸条,包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板;其特征在于:所述反应膜上具有包被有二甲戊灵半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线,所述结合物释放垫上喷涂有二甲戊灵单克隆抗体-胶体金标记物,所述二甲戊灵单克隆抗体是以二甲戊灵半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述二甲戊灵半抗原-载体蛋白偶联物由二甲戊灵半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白或人血清白蛋白,所述二甲戊灵半抗原是由N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺与4-溴丁酸乙酯反应生成烃基化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,再与浓硝酸反应生成硝基烃基化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,然后与氢氧化钾反应得到,其分子结构式为:



2. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于:所述二甲戊灵半抗原的制备反应过程如下:



3. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于:所述样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次粘贴在底板上,且结合物释放垫1/3~1/2被覆盖于样品吸收垫下。

4. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于:所述羊抗鼠抗抗体是以鼠源抗体为免疫原对山羊进行免疫制备获得。

5. 一种制备权利要求1-4任一项所述试纸条的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 制备喷涂有二甲戊灵单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

2) 制备具有包被有二甲戊灵半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线的反应膜;

3) 将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和底板组装成试纸条。

6. 一种应用权利要求1-4任一项所述试纸条检测烟叶样品中二甲戊灵的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

- 1) 对样品进行前处理；
- 2) 用所述试纸条进行检测；
- 3) 分析检测结果。

## 一种检测二甲戊灵的试纸条及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及二甲戊灵的检测,具体是一种用于检测二甲戊灵的试纸条及其制备方法和应用,其特别适用于烟叶中二甲戊灵残留的检测。

### 背景技术

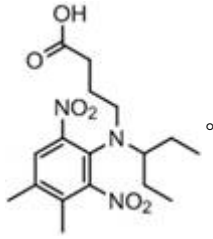
[0002] 二甲戊灵(Pendimethalin)属于二硝基苯胺类除草剂,其作用机制为抑制分生组织细胞分裂。双子叶植物吸收二甲戊灵的部位为下胚轴,单子叶植物吸收部位为幼芽。二甲戊灵适用于玉米、大豆、小麦、花生、棉花等多种旱地作物防除马唐、狗尾草、马齿苋等一年生禾本科和阔叶杂草。烟草上主要用于化学抑芽和烟草杂草防除。依据中国农药急性毒性分级标准,二甲戊灵被划分为一种低毒的化合物。依据美国环保局EPA的毒物分类标准,二甲戊灵属于III类,低毒化合物,安全摄入量为每天0.13mg/kg。根据我国2016年发布的国家标准《GB2763-2016食品中农药最大残留限量》的规定,稻谷、韭菜、结球甘蓝、普通白菜、菠菜、芹菜、大白菜中二甲戊灵的最大残留限量为0.2 mg/kg,糙米、玉米、棉籽、大蒜、莴苣中二甲戊灵的最大残留限量为0.1 mg/kg。国际烟草科学研究合作中心(CORESTA)规定烟草中二甲戊灵的指导性残留限量为5 mg/kg。

[0003] 目前二甲戊灵的检测方法主要是仪器检测方法,如气相色谱法、气相色谱-质谱法、气相色谱串联质谱法、高效液相色谱法、液相色谱串联质谱法,等。但是由于仪器设备昂贵,技术水平要求较高,样品还需要进行纯化处理,不利于现场筛查。因此,开发一种不受检测设备限制并且能够实现对大批量样品进行快速检测的产品和方法成为迫切需要解决的问题。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有检测二甲戊灵的方法存在的对设备依赖性高,并且不能够实现对大批量样品快速检测的问题,提供一种操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低、不受检测设备限制的试纸条及其制备方法和应用,以实现大批量样品中二甲戊灵快速检测和现场监控。

[0005] 为了实现本发明的目的,本发明提供了一种检测二甲戊灵的试纸条,该试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板;其中,所述反应膜上具有包被有二甲戊灵半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线,所述结合物释放垫上喷涂有二甲戊灵单克隆抗体-胶体金标记物;所述二甲戊灵单克隆抗体是以二甲戊灵半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述二甲戊灵半抗原-载体蛋白偶联物由二甲戊灵半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白或人血清白蛋白,所述二甲戊灵半抗原是由N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺与4-溴丁酸乙酯反应生成烃基化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,再与浓硝酸反应生成硝基烃基化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,再与氢氧化钾反应得到,其分子结构式为:



[0006] 所述二甲戊灵半抗原的具体制备方法如下：

1) 取1.00 g N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,加80 mL丙酮溶解,加0.35 g 氢氧化钾,加1.21 g 4-溴丁酸乙酯,加热回流反应3 h,TLC检测,原料全部反应完成,停止反应,冷却到室温,旋蒸,除去丙酮,加60 mL水,加50 mL二氯甲烷萃取,有机相无水硫酸钠干燥,蒸干浓缩,上硅胶柱,使用体积比为10:1的石油醚/乙酸乙酯洗脱分离,得到中间体烃基化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺1.51 g;

2) 取1.50 g中间体烃基化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,加5 mL浓硫酸溶解澄清,在冰浴下缓慢滴加浓硝酸3 mL,恢复至室温,继续搅拌4 h,停止反应,冰浴下加蒸馏水30 mL,加氢氧化钠溶液调节pH值到7,加50 mL乙酸乙酯萃取,无水硫酸钠干燥蒸干,得到红色油状物,使用体积比为1:5的二氯甲烷/正己烷重结晶,得到硝基烃化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺1.81 g;

3) 取1.80 g硝基烃化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺加2 mol/L氢氧化钾水溶液,60 °C搅拌3 h,TLC检测,原料无剩余,停止反应,冷却到室温,加稀盐酸,调节pH值到6,加80 mL乙酸乙酯萃取,有机相水洗,无水硫酸钠干燥,蒸干,使用体积比为1:1的乙醚/正己烷重结晶,得到二甲戊灵半抗原产物1.60 g。

[0007] 所述羊抗鼠抗抗体是以鼠源抗体为免疫原对山羊进行免疫制备获得。

[0008] 所述样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次粘贴在底板上,所述结合物释放垫1/3~1/2被覆盖于样品吸收垫下。

[0009] 所述底板为PVC底板或其他硬质不吸水的材料;所述样品吸收垫为吸滤纸或滤油纸;所述结合物释放垫为玻璃棉或聚酯材料;所述吸水垫为吸水纸;所述反应膜为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜。

[0010] 一种制备上述试纸条的方法,包括以下步骤:

- 1) 制备喷涂有二甲戊灵单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;
- 2) 制备具有包被有二甲戊灵半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线的反应膜;
- 3) 将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和底板组装成试纸条。

[0011] 更具体地说,制备试纸条的过程为:

- 1) 将N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺与4-溴丁酸乙酯反应生成烃基化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,再与浓硝酸反应生成硝基烃化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,再与氢氧化钾反应得到二甲戊灵半抗原;
- 2) 将二甲戊灵半抗原与载体蛋白偶联,制备二甲戊灵半抗原-载体蛋白偶联物;
- 3) 用二甲戊灵半抗原-载体蛋白偶联物免疫小鼠,将小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到分泌二甲戊灵单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

- 4) 提取小鼠IgG免疫健康山羊,得到羊抗鼠抗抗体;
- 5) 分别将二甲戊灵半抗原-载体蛋白偶联物和羊抗鼠抗抗体包被于反应膜的检测线(T)和质控线(C)上;
- 6) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;
- 7) 将制备的二甲戊灵单克隆抗体加入到制备的胶体金中,得到二甲戊灵单克隆抗体-胶体金标记物;
- 8) 将二甲戊灵单克隆抗体-胶体金标记物喷涂在结合物释放垫上,37℃烘1 h后取出,置于干燥环境中保存备用;
- 9) 将样品吸收垫用含0.5%牛血清白蛋白(质量分数)、pH值为7.2的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液浸泡2 h,37℃下烘干2 h;
- 10) 在底板上按顺序粘贴上样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫,结合物释放垫从起始端有1/3区域被样品吸收垫覆盖。最后切成3 mm宽的小条,加塑料盒,真空包装,4~30℃条件下可保存12个月。结合物释放垫的1/3被样品吸收垫覆盖可以延长检测结果观察时间,可使样品吸收垫将检测液体充分吸收并与金标抗体充分反应,从而减少误差。

[0012] 应用上述试纸条检测样品中二甲戊灵的方法,包括如下步骤:

- 1) 对样品进行前处理;
- 2) 用试纸条进行检测;
- 3) 分析检测结果。

[0013] 本发明的检测二甲戊灵的试纸条采用高度特异性的抗体抗原反应及免疫层析分析技术,将二甲戊灵单克隆抗体-胶体金标记物固定于结合物释放垫上,样品中的二甲戊灵在流动过程中,与结合物释放垫上的二甲戊灵单克隆抗体-胶体金标记物结合,形成二甲戊灵-抗体-胶体金标记物。样本中的二甲戊灵与反应膜检测线上的二甲戊灵半抗原-载体蛋白偶联物竞争结合二甲戊灵单克隆抗体-胶体金标记物,根据检测线红色条带深浅来判断待测样品液中是否含有二甲戊灵残留。

[0014] 检测时,样品经处理后滴入样品吸收垫,当二甲戊灵在样品中的浓度低于检测限或为零时,单克隆抗体-胶体金标记物在层析过程中会与固定在反应膜上的二甲戊灵半抗原-载体蛋白偶联物结合,在检测线(T)和质控线(C)处各出现一条红色条带,且T线显色比C线显色深或与C线显色一致;如果二甲戊灵在样品中的浓度等于或高于检测限,单克隆抗体-胶体金标记物会与二甲戊灵全部结合,从而在T线处因为竞争反应不会与二甲戊灵半抗原-载体蛋白偶联物结合而不出现红色条带或比C线显色浅。如图2所示。

[0015] 阴性:当质控线(C)显示出红色条带,检测线(T)同时也显示出红色条带,且(T)线颜色接近或深于(C)线时,判为阴性。

[0016] 阳性:当质控线(C)显示出红色条带,而检测线(T)不显色或(T)线颜色浅于(C)线时,判为阳性。

[0017] 无效:当质控线(C)不显示出红色条带,则无论检测线(T)显示出红色条带与否,该试纸条均判为无效。

[0018] 目前尚无用于检测烟草中二甲戊灵的胶体金试纸条,本发明填补了该项空白。本发明的半抗原具有适当末端活性基团,修饰位点及间隔臂长度选择合适,且能最大程度模拟二甲戊灵的分子结构,以此半抗原为基础开发的试纸条具有灵敏度高、特异性强的特点。

同时本发明的试纸条具有成本低、操作简单、检测时间短、不受检测设备限制、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点。综上,用本发明试纸条检测二甲戊灵的方法,简便、快速、直观、准确、适用范围广、成本低、易推广使用。

### 附图说明

[0019] 图1为试纸条剖面结构示意图,图中:1、样品吸收垫;2、结合物释放垫;3、反应膜;4、吸水垫;5、检测线;6、质控线;7、底板;

图2为试纸条检测结果判定图;

图3为二甲戊灵半抗原合成图(该图作为摘要附图)。

### 具体实施方式

[0020] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。另外,本领域的技术人员在所附权利要求书限定的范围内可能会对本发明进行各种改动或修饰,这些改动或修饰同样应落入发明的保护范围。

[0021] 实施例1 检测二甲戊灵的试纸条的制备

该试纸条的制备方法主要包括以下步骤:

- 1) 制备喷涂有二甲戊灵单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;
- 2) 制备具有包被有二甲戊灵半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线的反应膜;
- 3) 将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和PVC底板组装成试纸条。

[0022] 下面分步详细叙述:

1、二甲戊灵半抗原的合成(合成路线见图3)及鉴定

取1.00 g N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,加80 mL丙酮溶解,加0.35 g 氢氧化钾,加1.21 g 4-溴丁酸乙酯,加热回流反应3 h,TLC检测,原料全部反应完成,停止反应,冷却到室温,旋蒸,除去丙酮,加60 mL水,加50 mL二氯甲烷萃取,有机相无水硫酸钠干燥,蒸干浓缩,上硅胶柱,使用体积比为10:1的石油醚/乙酸乙酯洗脱分离,得到中间体烃基化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺1.51 g,收率94.97%;

取1.50 g中间体烃基化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺,加5 mL浓硫酸溶解澄清,在冰浴下缓慢滴加浓硝酸3 mL,恢复至室温,继续搅拌4 h,停止反应,冰浴下加蒸馏水30 mL,加氢氧化钠溶液调节pH值到7,加50 mL乙酸乙酯萃取,无水硫酸钠干燥蒸干,得到红色油状物,使用体积比为1:5的二氯甲烷/正己烷重结晶,得到硝基烃化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺1.81 g,收率93.30%;

取1.80 g硝基烃化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺加2 mol/L氢氧化钾水溶液,60℃搅拌3 h,TLC检测,原料无剩余,停止反应,冷却到室温,加稀盐酸,调节pH值到6,加80 mL乙酸乙酯萃取,有机相水洗,无水硫酸钠干燥,蒸干,使用体积比为1:1的乙醚/正己烷重结晶,得到二甲戊灵半抗原产物1.60 g,收率95.81%。

[0023] 核磁鉴定<sup>1</sup>H NMR(CDC1<sub>3</sub>, 300MHZ) δ: 11.00 (1H, s), 2.398 (6H, s), 2.61 (1H, t), 3.655 (2H, s, J=7.500), 8.213 (1H, s), 1.419 (4H, qd, J=7.126, J=

7.017), 1.923 (2H, tt, J=7.500, J=7.367), 0.829 (6H, t, J=7.126)。化学位移 $\delta$ =11.0的为间隔臂羧基氢共振吸收峰, $\delta$ =3.655、1.923、2.398的为间隔臂上亚甲基氢的共振吸收峰,这些峰的存在,证明间隔臂偶联成功。

#### [0024] 2、二甲戊灵偶联抗原的合成及鉴定

免疫原制备——二甲戊灵半抗原与人血清白蛋白(HSA)偶联得到免疫原。

[0025] 取二甲戊灵半抗原10 mg,加二甲基亚砜(DMSO)溶解,加碳二亚胺(EDC)5.7 mg,搅拌,澄清,加N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)3.8 mg,室温搅拌活化3 h,得到A液;取HAS 50 mg,加8 mL 0.1 mol/L PB缓冲液溶解,得到B液,将A液缓慢滴加到B液中,室温搅拌反应5 h。停止反应,0.02 M PBS缓冲液透析3天,每天换液三次,得到二甲戊灵-HSA免疫原,分装,-20℃保存,备用。

[0026] 包被原制备——二甲戊灵半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0027] 取二甲戊灵半抗原6 mg,加0.2 mL 二甲基甲酰胺(DMF)溶解,澄清,加三乙胺20  $\mu$  L,搅拌5 min,加氯甲酸异丁酯6  $\mu$  L,搅拌2 h,得到半抗原活化液A液;取OVA 50 mg,加8 mL 0.05 mol/L pH 值为7.2的PB缓冲液溶解,得到B液,将A液缓慢滴加到B液中,室温搅拌反应5 h。停止反应,0.02 M PBS缓冲液透析3天,每天换液三次,得到二甲戊灵-OVA包被原,分装,-20℃保存,备用。

#### [0028] 3、二甲戊灵单克隆抗体的制备

##### 1) 杂交瘤细胞的获得

首次免疫:将二甲戊灵半抗原-HSA偶联物(免疫原)与等量的弗氏完全佐剂充分乳化,皮下注射6周龄的Balb/c小鼠,每只0.2 mL;

加强免疫两次:从首次免疫开始,每两周加强免疫一次,用弗式不完全佐剂代替弗氏完全佐剂,方法和剂量同首次免疫;

最后一次加强免疫一周后眼底静脉采血测效价和抑制,有抑制且效价达到1:10000以上时进行如下末次免疫:腹腔注射不加任何佐剂的免疫原溶液0.1 mL,三天后处死小鼠,取其脾脏与骨髓瘤细胞融合;

采用间接竞争酶联免疫分析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,得到并建立稳定分泌二甲戊灵单克隆抗体的杂交瘤细胞株,取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。

##### [0029] 2) 单克隆抗体的制备

细胞复苏:取出二甲戊灵单克隆抗体杂交瘤细胞株冻存管,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;

制备腹水与抗体纯化:采用体内诱生法,将Balb/c小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油0.5 mL/只,7天后腹腔注射杂交瘤细胞 $5 \times 10^5$ 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化,得到二甲戊灵单克隆抗体溶液(-20℃保存)。

##### [0030] 3) 单克隆抗体效价的测定

用间接竞争 ELISA法测定抗体的效价为1:(200000~500000)。

[0031] 间接竞争ELISA方法:用二甲戊灵半抗原-OVA偶联物包被酶标板,加入二甲戊灵标准品溶液、二甲戊灵单克隆抗体溶液和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体溶液,25℃反应30 min,倒出孔内液体,用洗涤液洗涤3~5次,用吸水纸拍干;加入底物显色液,25℃反应

15 min后,加入终止液终止反应;设定酶标仪于波长450 nm处测定每孔吸光度值。

#### [0032] 4) 单克隆抗体特异性的测定

抗体特异性是指它同特异性抗原结合的能力与同该类抗原类似物结合能力的比较,常用交叉反应率作为评价标准。交叉反应越小,抗体的特异性则越高。

[0033] 本实验将二甲戊灵、氟节胺、仲丁灵、氟乐灵、乙丁氟灵做系列稀释,分别与单克隆抗体进行间接竞争ELISA,制作标准曲线,分析得到IC<sub>50</sub>,然后按下式计算交叉反应率:

交叉反应率 (%) =	引起 50%抑制的二甲戊灵浓度	×100%
	引起 50%抑制的其他二硝基苯胺类除草剂浓度	

结果显示各类似物的交叉反应率为:二甲戊灵100%、氟节胺<1%、仲丁灵<1%、氟乐灵<1%、乙丁氟灵<1%。本发明抗体对氟节胺、仲丁灵、氟乐灵、乙丁氟灵等其他二硝基苯胺类除草剂无交叉反应,只针对二甲戊灵有特异性结合。

#### [0034] 4、羊抗鼠抗抗体的制备

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。

#### [0035] 5、二甲戊灵单克隆抗体-胶体金标记物的制备

##### 1) 胶体金的制备

用双蒸去离子水将质量分数为1%的氯金酸溶液稀释成0.01%,取100 mL置于锥形瓶中,用恒温电磁搅拌器加热至沸腾,在持续高温、持续搅拌下加入1.5 mL质量分数为1%的柠檬酸三钠溶液,继续匀速搅拌加热至溶液呈透亮的酒红色时停止,冷却至室温后用去离子水恢复到原体积,4℃保存。制备良好的胶体金用肉眼观察是清亮透明的,没有混浊,液体表面无漂浮物,在日光下观察胶体金的颜色为酒红色。

##### [0036] 2) 二甲戊灵单克隆抗体-胶体金标记物的制备

在磁力搅拌下,用0.2 mol/L碳酸钾溶液调胶体金的pH值至7.2(不同抗体的pH值标记范围在7~8之间,可以变化),按每毫升胶体金溶液中加入20~50 μg抗体的标准向胶体金溶液中加入上述二甲戊灵单克隆抗体,搅拌混匀,室温静置10 min,加入10% BSA使其在胶体金溶液中的终质量分数为1%,静置10 min。12000 r/min,4℃离心40 min,弃上清液,沉淀用复溶缓冲液洗涤两次,用体积为初始胶体金体积1/10的复溶缓冲液将沉淀重悬,置4℃备用。

[0037] 复溶缓冲液:含BSA的质量分数为0.1%~0.3%、吐温-80的质量分数为0.05%~0.2%、pH值为7.2的0.02 mol/L磷酸盐缓冲液。

#### [0038] 6、结合物释放垫的制备

将结合物释放垫浸泡于含0.5% BSA(质量分数)、pH值为7.2的0.5 mol/L磷酸盐缓冲液中,均匀浸湿1 h,37℃烘3 h备用。用Isoflow喷膜仪将制备好的二甲戊灵单克隆抗体-胶体金标记物均匀喷涂在结合物释放垫上,每1 cm结合物释放垫喷涂0.01 mL二甲戊灵单克隆抗体-胶体金标记物后,置于37℃环境中(湿度<20%)60 min后取出,置于干燥环境(湿度<20%)中保存备用。

#### [0039] 7、反应膜的制备

将二甲戊灵半抗原-卵清蛋白偶联物包被到反应膜上构成检测线,将羊抗鼠抗抗体包被在反应膜上构成质控线。

[0040] 包被过程:用磷酸缓冲液将二甲戊灵半抗原-卵清蛋白偶联物稀释到1 mg/mL,用Isoflow点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测线(T),包被量为1.0  $\mu\text{L}/\text{cm}$ ;用0.01 mol/L、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释到200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,用Isoflow点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的质控线(C),包被量为1.0  $\mu\text{L}/\text{cm}$ 。将包被好的反应膜置于37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下干燥2 h,备用。

#### [0041] 8、样品吸收垫的制备

将样品吸收垫用含0.5%牛血清白蛋白(质量分数)、pH值为7.2的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液浸泡2 h,37 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干2h备用。

#### [0042] 9、试纸条的组装

将样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次按顺序粘贴在PVC底板上;结合物释放垫从起始端有1/3区域被样品吸收垫覆盖,结合物释放垫的末端与反应膜的始端连接,反应膜的末端与吸水垫的始端相连,样品吸收垫的始端与PVC底板的始端对齐,吸水垫的末端与PVC底板的末端对齐;所述反应膜上有检测线和质控线,检测线(T)和质控线(C)均呈与所述试纸条的长相垂直的条状带;检测线位于靠近结合物释放垫的末端的一侧;质控线位于远离结合物释放垫的末端的一侧;将试纸条用机器切成3 mm宽的小条,装在特制的塑料制卡中,4~30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下可保存12个月。

#### [0043] 实施例2 烟叶样本中二甲戊灵的检测

##### 1、样本的前处理

称取 $1.0 \pm 0.05$  g粉碎的样本至聚苯乙烯离心管中,加入4 mL甲醇,涡旋振荡3 min,6000 rpm室温(20-25  $^{\circ}\text{C}$ )离心5 min,取25  $\mu\text{L}$ 上清液加入475  $\mu\text{L}$ 去离子水混匀后待测。

##### [0044] 2、用试纸条进行检测

用一次性吸管吸取待检样本溶液2~3滴垂直滴于加样孔中,液体流动时开始计时,反应10 min,判定结果。

##### [0045] 3、分析检测结果

阴性(-):T线显色比C线显色深或与C线显色一致,表示样品中二甲戊灵浓度低于检测限,如图2a、2b。

[0046] 阳性(+):T线显色比C线显色浅或T线不显色,表示样品中二甲戊灵浓度等于或高于检测限,如图2c、2d。

[0047] 无效:未出现C线,表明不正确的操作过程或试纸条已变质失效,如图2e、2f。在此情况下,应再次仔细阅读说明书,并用新的试纸条重新测试。

#### [0048] 实施例3 样品检测实例

##### 1、检测限试验

取空白烤后烟叶样品,在其中分别添加二甲戊灵至终浓度为2.5、5、10 mg/kg,取试纸条进行检测,每个样本重复测定三次。

[0049] 用试纸条检测烤后烟叶样品时,当其中二甲戊灵添加浓度为2.5 mg/kg时,试纸条上显示出T线显色比C线显色深或与C线显色一致,呈阴性;当其中二甲戊灵添加浓度为5、10 mg/kg时,试纸条上显示出T线显色比C线显色浅或T线不显色,呈阳性。表明本试纸条对烤后烟叶中二甲戊灵的检测限为5 mg/kg。

##### [0050] 2、假阳性率、假阴性率试验

取已知二甲戊灵含量大于5 mg/kg的烤后烟叶阳性样品20份,已知二甲戊灵含量小于5 mg/kg的烤后烟叶阴性样品20份,用三批试纸条进行检测,计算其阴阳性率。

[0051] 结果表明:用3个批次生产的试纸条检测阳性样品时,结果全为阳性,可知阳性样品符合率为100%,假阴性率为0;检测阴性样品时,结果全为阴性,可知阴性样品符合率为100%,假阳性率为0。说明本发明的检测二甲戊灵的试纸条可以对烤后烟叶和鲜烟叶中的二甲戊灵进行快速检测。

### [0052] 3、特异性试验

将氟节胺、仲丁灵、氟乐灵、乙丁氟灵等二甲戊灵结构类似物用pH值为7.2、0.2 mol/L的磷酸盐缓冲液稀释至500 mg/L,用二甲戊灵试纸条进行检测。结果显示,用该试纸条检测500 mg/L氟节胺、仲丁灵、氟乐灵、乙丁氟灵时,试纸条T线显色比C线显色深或与C线显色一致,呈阴性。说明本试纸条对氟节胺、仲丁灵、氟乐灵、乙丁氟灵等二甲戊灵结构类似物无交叉反应。

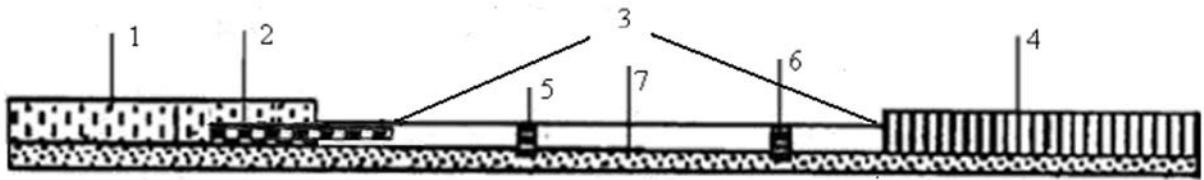


图1

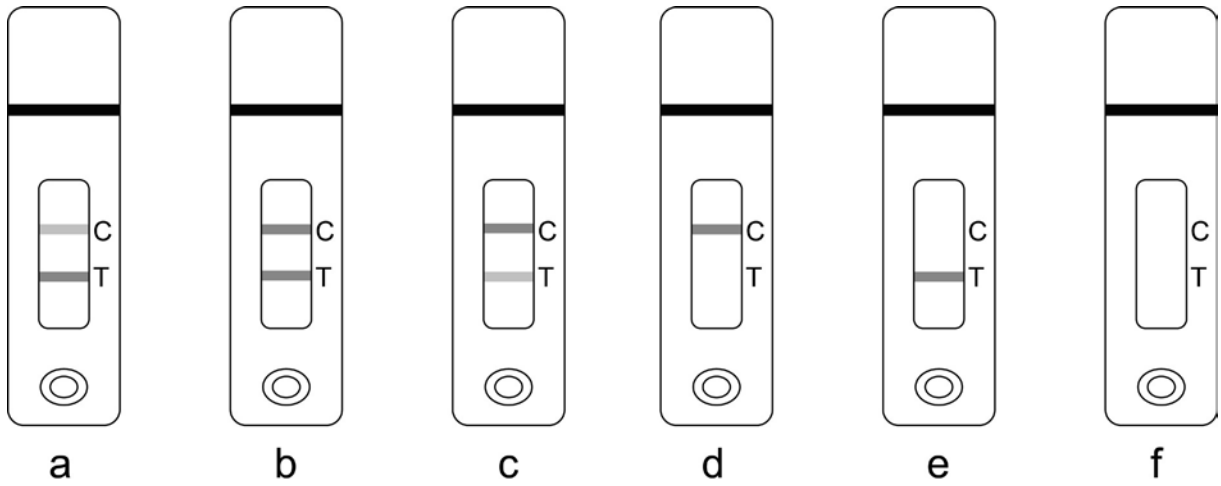


图2

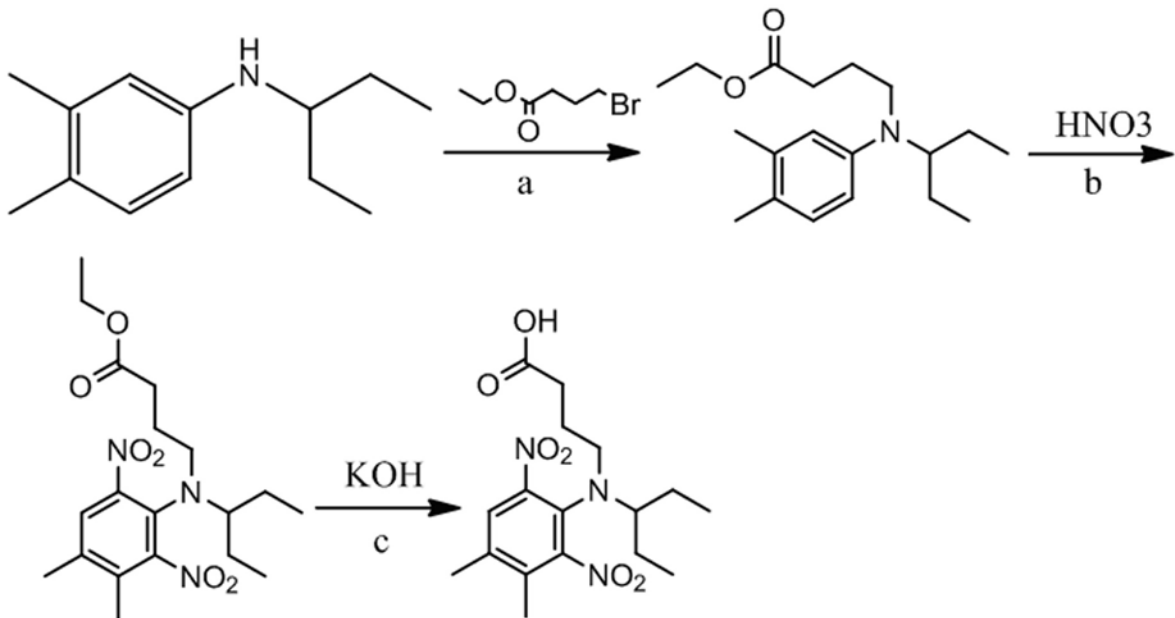


图3

专利名称(译)	一种检测二甲戊灵的试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN109061147A</a>	公开(公告)日	2018-12-21
申请号	CN201811104529.2	申请日	2018-09-21
[标]申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院 国家烟草质量监督检验中心 北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院 国家烟草质量监督检验中心 北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院 国家烟草质量监督检验中心 北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	范子彦 陈黎 何方洋 李旭 刘惠民 唐纲岭 潘立宁 颜权平 鲁亚辉		
发明人	范子彦 陈黎 何方洋 李旭 刘惠民 唐纲岭 潘立宁 颜权平 鲁亚辉		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/58 G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N33/577 G01N33/58		
代理人(译)	姜振东		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种检测二甲戊灵的试纸条及其制备方法和应用，该试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板；其特征是：反应膜上具有包被有二甲戊灵半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线，结合物释放垫上喷涂有二甲戊灵单克隆抗体-胶体金标记物。二甲戊灵半抗原是由N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺与4-溴丁酸乙酯反应生成烃基化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺，再与浓硝酸反应生成硝基烃化N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺，然后与KOH反应得到。本发明的优点在于：操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低、不受检测设备限制，可实现对大批量二甲戊灵样品进行快速检测和现场监控。

