



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107557358 B

(45)授权公告日 2020.05.19

(21)申请号 201710639958.9

G01N 33/58(2006.01)

(22)申请日 2017.07.31

G01N 33/531(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107557358 A

(43)申请公布日 2018.01.09

(73)专利权人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 许艇 王楷 林优优 刘志平

李季 布鲁斯·杜普里·哈莫克

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

公司 11002

代理人 王文君 黄爽

(51)Int.Cl.

C12N 15/11(2006.01)

C12N 15/10(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

(56)对比文件

CN 106680484 A,2017.05.17,

CN 101100486 A,2008.01.09,

CN 106680484 A,2017.05.17,

a.krebber et al..reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system.《journal of immunological methods》.1997,第201卷(第1期),

陈静.建立甲胎蛋白的纳米抗体-RT-PCR超灵敏分析方法.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技I辑》.2016,

审查员 张丽玮

权利要求书1页 说明书7页

序列表3页 附图1页

(54)发明名称

一种适用于氟虫腈残留分析的VHH-ELISA试剂盒

(57)摘要

本发明公开了基于纳米抗体检测氟虫腈残留的ELISA试剂盒及其应用,所述试剂盒包括盒体、设在盒体内的酶标板以及试剂;其中,酶标板的每个孔包被有氟虫腈包被抗原,所述试剂包括抗氟虫腈纳米抗体、氟虫腈标准溶液、酶标记的二抗、缓冲液PBS、洗涤液PBST、底物液、显色液和反应终止液等。检测过程中,酶标板孔壁上吸附的包被抗原和待测氟虫腈相互竞争与抗体反应,通过显色反应观察结果。本发明还提供一条用于构建驼科动物噬菌体展示纳米抗体文库的C端通用PCR引物。本发明的优点是能准确灵敏地检测水、蔬菜中氟虫腈残留,样品的前处理过程简单,耗时少,能同时检测大量的样品,样品检测成本远低于传统的仪器检测方法。

1. 抗氟虫腓纳米抗体,其特征在於,所述抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 分析氟虫腓残留的ELISA检测试剂盒,包括盒体、设在盒体内可拆卸的酶标板以及设在盒体内的试剂,其特征在於,所述酶标板的每个孔包被有氟虫腓包被抗原,所述试剂包括权利要求1所述纳米抗体、氟虫腓标准溶液、酶标记的二抗、缓冲液PBS、洗涤液PBST、显色液和反应终止液。
 3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在於,所述氟虫腓包被抗原为半抗原6-(3-氰基-5-(2,6-二氯-4-(三氟甲基苯基)环戊-1,3-二烯-1-基)氨基)-6-氧代己酸与牛血清蛋白的偶联复合物,所述包被抗原的制备方法如下:
 - (1) 称8.8mg 6-(3-氰基-5-(2,6-二氯-4-(三氟甲基苯基)环戊-1,3-二烯-1-基)氨基)-6-氧代己酸、2.65mg NHS、4.8mg DCC溶于200 μ L无水DMF中,室温下搅拌反应过夜;将反应液离心,弃沉淀,上清液为活性酯;
 - (2) 称20mg BSA溶于0.05mol/mL pH9.5的碳酸盐缓冲溶液2mL中,搅拌下逐滴加入150 μ L上述活性酯,20~30min加完;然后室温下继续搅拌反应4~6h;
 - (3) 反应液装入透析袋内,用0.01mol/L pH7.4的PBS透析;每6~8h换液一次,共换液5~6次;透析后离心,弃沉淀,取上清液作为抗原包被液。
 4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在於,所述酶标板为96孔酶标板,包被抗原的包被浓度为165ng/mL。
 5. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在於,所述显色液包括A液和B液,A液由过氧化脲1g、柠檬酸10.3g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.8g、吐温-20 100 μ L和蒸馏水1000mL配制而成,pH值5;B液由四甲基联苯胺700mg、DMSO 40mL、柠檬酸10.3g和蒸馏水1000mL配制而成,pH值2.4。
 6. 根据权利要求2-5任一项所述的试剂盒,其特征在於,所述反应终止液为2M的硫酸液。
 7. 氟虫腓ELISA检测试剂,其有效成分为权利要求1所述纳米抗体。
 8. 权利要求2-6任一项所述试剂盒或权利要求7所述试剂在ELISA法检测样品中氟虫腓残留的应用。

一种适用于氟虫腈残留分析的VHH-ELISA试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程、噬菌体展示技术以及ELISA检测技术领域,具体地说,涉及基于纳米抗体检测氟虫腈残留的ELISA试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 氟虫腈(Fipronil)又名芬普尼、锐劲特、非泼罗尼,是一种应用较为广泛的带有三氟甲基磺酰基团的N-苯基吡唑类杀虫剂,对危害粮、棉、油、果蔬、茶叶等主要农作物的害虫都有良好的防治效果。在农药的使用过程中,很多害虫对机磷农药、氨基甲酸酯类农药和拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗性。对于此类抗性昆虫,氟虫腈亦有较好的效果。氟虫腈对水产、蜜蜂、家蚕、啮齿类动物、鸟类均有毒性较大,对哺乳动物的毒性中等,氟虫腈会损害人类 β 3GABAA受体亚单位导致人类神经发育障碍,如自闭症、安格尔曼综合征、癫痫等。由于氟虫腈常用于宠物身上,在人类和宠物接触的过程中同样存在风险。由于在有毒环境中的暴露,有可能会儿童和胎儿的大脑和神经系统发育。

[0003] 在甲胺磷、对硫磷等高毒有机磷杀虫剂被限制或禁止使用之后,自2009年起,农业部规定氟虫腈除作为卫生及种子包衣剂等,限制田间使用。虽然氟虫腈已经被限用,但仍有违规现象发生。一些农药销售公司将氟虫腈用于农作物的使用宣传,或将其非法添加于其他农药已达到良好的防虫效果。由于氟虫腈半衰期较长、易残留,环境和食品中残留超标问题逐渐引起关注。因此,加强氟虫腈残留的检测,对于科学合理地使用氟虫腈,保障食品安全和人类健康,减少环境污染,增强我国农副产品的国际竞争力,保持我国农业的可持续发展等具有重要意义。

[0004] 目前已报道的氟虫腈残留检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱法(GC)和色谱-质谱联用(GC/LC-MS)。运用这些方法需要专业化的实验室、专用仪器设备及专业操作人员,样品前处理复杂,分析成本高,难以满足大量样本现场快速监测的需要。20世纪90年代以来,快速发展的免疫分析技术已被应用于农药残留分析和环境监测,具有简便快速、廉价高效、特异性强、灵敏度高等优点。

[0005] 基于常规抗体(多克隆抗体和单克隆抗体)的氟虫腈残留酶联免疫吸附分析方法稳定性相对较低,本发明以抗氟虫腈纳米抗体为基础,采用酶联免疫吸附分析方法,其热稳定性均优于多克隆抗体免疫分析方法。

发明内容

[0006] 本发明的目的是针对目前农药残留仪器分析方法成本高、前处理复杂、特异性差、灵敏度低和难以实验现场检测等不足,提供一种具有高特异性、高灵敏度、高准确度、高精度、操作方法简单,并能用于大批量样品快速检测的,分析氟虫腈残留的ELISA检测试剂盒。适用于水、蔬菜等样品中氟虫腈残留的快速测定。

[0007] 为了实现本发明目的,本发明首先提供一条用于构建驼科动物噬菌体展示纳米抗体文库的C端通用PCR引物,所述引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示。

[0008] 继而本发明提供一种抗氟虫腓纳米抗体,所述抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,或该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。例如,将SEQ ID NO:1所示序列去掉末端6个组氨酸标签后的氨基酸序列。

[0009] 所述抗氟虫腓纳米抗体可以按如下方法进行制备:利用化学反应合成氟虫腓的半抗原6-(3-氰基-5-(2,6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)环戊-1,3-二烯-1-基)氨基)-6-氧代己酸,将半抗原与钥孔血蓝蛋白KLH偶联后作为免疫原,免疫实验动物骆驼,提取外周血淋巴细胞的总RNA,经反转录及巢式PCR,克隆出纳米抗体重链(VHH)基因片段,通过酶切连接,将基因片段克隆至噬菌粒载体,高效电转化至大肠杆菌,经辅助噬菌体拯救,构建得到噬菌体纳米抗体库,筛选出特异的氟虫腓噬菌体纳米抗体,将其表达纯化,得到灵敏度高、特异性强的抗氟虫腓纳米抗体。制备的纳米抗体分子小,可剪性强,耐高温,易纯化,易表达。

[0010] 本发明提供的分析氟虫腓残留的ELISA检测试剂盒,包括盒体、设在盒体内可拆卸的酶标板以及设在盒体内的试剂。其中,所述酶标板的每个孔包被有氟虫腓包被抗原,所述试剂包括所述抗氟虫腓纳米抗体、氟虫腓标准溶液、酶标记的二抗、缓冲液PBS、洗涤液PBST、显色液(A液)、显色液(B液)和反应终止液等。

[0011] 所述氟虫腓包被抗原为半抗原6-(3-氰基-5-(2,6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)环戊-1,3-二烯-1-基)氨基)-6-氧代己酸与牛血清蛋白的偶联复合物,所述包被抗原的制备方法如下:

[0012] (1)称8.8mg(40.15mmol)6-(3-氰基-5-(2,6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)环戊-1,3-二烯-1-基)氨基)-6-氧代己酸(MW=440.15)、2.65mg(0.024mmol)NHS(N-羟基琥珀酰亚胺,MW=115)、4.8mg(0.023mmol)DCC(二环己基碳二亚胺,MW=206)溶于200μL无水DMF(N-甲酰吗啉)中,室温下搅拌反应过夜。将反应液离心(5000rpm,10min),弃沉淀,上清液为活性酯,即6-(3-氰基-5-(2,6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)环戊-1,3-二烯-1-基)氨基)-6-氧代己酸。

[0013] (2)称20mg BSA(牛血清蛋白,MW=67000)溶于2mL碳酸盐缓冲溶液(0.05mol/mL、pH9.5)中,搅拌下逐滴加入150μL活性酯液,滴加时缓慢,约20~30min加完。然后室温下继续搅拌反应4~6h。

[0014] (3)反应液装入透析袋内,用PBS(0.01mol/L pH7.4)透析。每6~8h换液一次,共换液5~6次。透析后离心,弃沉淀,取上清液,作为抗原包被液。所述酶标板为96孔酶标板,包被抗原的包被浓度为165ng/mL。

[0015] 所述纳米抗体的浓度约为100ng/mL。所述酶标记的二抗为辣根过氧化物酶标记的抗HA标签抗体(购自Abcam公司,商品编号:ab1265),浓度为0.1μg/mL。

[0016] 所述显色液A液由过氧化脲1g、柠檬酸10.3g、Na₂HPO₄·12H₂O 35.8g、吐温-20 100μL和蒸馏水1000mL配制而成,pH值5。

[0017] 所述显色液B液由四甲基联苯胺700mg、DMSO 40mL、柠檬酸10.3g和蒸馏水1000mL配制而成,pH值2.4。

[0018] 所述反应终止液为2M的硫酸液。

[0019] 本发明还提供一种氟虫腓ELISA检测试剂,其有效成分为所述抗氟虫腓纳米抗体。

[0020] 本发明进一步提供所述试剂盒或试剂在ELISA法检测样品中氟虫腓残留的应用。分析检测时,向包被有所述氟虫腓包被抗原的酶标板的各孔中依次加入待测氟虫腓样品和所述抗氟虫腓纳米抗体,固相包被抗原和待测氟虫腓相互竞争与纳米抗体反应,由于每个

孔中的固相抗原和加入的纳米抗体含量均一致,因此当待测的氟虫腈浓度高时,则被结合在固相抗原上的抗体少,加入的酶标二抗与被固定抗体结合量少,最后加入底物液和显色液,显色反应浅,用酶标仪检测的OD值低,表明抑制率高;反之,当待测氟虫腈浓度低时,则所测的OD值高,抑制率低。根据用已知浓度的氟虫腈标准溶液检测所绘制标准曲线,即可推算出待测氟虫腈的浓度。

[0021] 本发明能准确灵敏地检测水和蔬菜中氟虫腈残留,样品的前处理过程简单。对于水样,只需将其过滤后进行检测;对于蔬菜样品的前处理,参见“三唑磷残留检测直接竞争ELISA试剂盒的研制及应用,梁赤周等,中国食品学报,第8卷第6期,2008年12月”。本方法耗时少,能同时检测大量的样品,样品检测成本远低于传统的仪器检测方法。本发明对解决大批量样品的氟虫腈残留检测,实现现场监控具有重要的现实意义。

附图说明

[0022] 图1为本发明实施例5中基于纳米抗体F1的氟虫腈的标准抑制曲线。曲线回归方程为 $y = -0.1082 + 1.0822 / [1 + (x/5.7877)^{0.7771}]$ ($R^2 = 0.9938$) 抑制中浓度 $IC_{50} = 4.2\text{ng/mL}$, 最低检测限 $IC_{10} = 0.2\text{ng/mL}$ 。

具体实施方式

[0023] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例均按照常规实验条件,如Sambrook等分子克隆实验手册(Sambrook J&Russell DW, Molecular Cloning:a Laboratory Manual,2001),或按照制造厂商说明书建议的条件。

[0024] 实施例1氟虫腈包被抗原的制备

[0025] 以半抗原和牛血清蛋白制备偶联复合物,作为包被抗原。制备方法如下:

[0026] (1)称8.8mg 6-(3-氰基-5-(2,6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)环戊-1,3-二烯-1-基)氨基)-6-氧代己酸(MW=440.15)(0.02mmol)、2.65mg NHS(MW=115)(0.024mmol)、4.8mg DCC(MW=206)(0.023mmol)溶于200 μL 无水DMF中,室温下搅拌反过夜反应。将反应液离心(5000rpm,10min),弃沉淀,上清液为活性酯。

[0027] (2)称20mg BSA(MW=67000)溶于2mL碳酸盐缓冲溶液(0.05mol/mL、pH9.5)中,搅拌下逐滴加入150 μL 活性酯液,滴加时缓慢,约20~30min加完。然后室温下继续搅拌反应4~6h。

[0028] (3)反应液装入透析袋内,用PBS(0.01mol/L pH7.4)透析。每6~8h换液一次,总共换液5~6次。透析后离心,弃沉淀,取上清液,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0029] 实施例2氟虫腈噬菌体展示纳米抗体库的构建

[0030] 采用活性酯法将半抗原与钥孔血蓝蛋白偶联,具体方法如下:

[0031] (1)称66.02mg 6-(3-氰基-5-(2,6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)环戊-1,3-二烯-1-基)氨基)-6-氧代己酸(MW=440.15)(0.15mmol)、17.825mg NHS(MW=115)(0.155mmol)、31.518mg DCC(MW=206)(0.153mmol)溶于1500 μL 无水DMF中,室温下搅拌反应过夜。将反应液离心(5000rpm,10min),弃沉淀,上清液为活性酯。

[0032] (2)取6mL KLH溶液(6.8mg/mL),搅拌下逐滴加入1200 μL 活性酯液,滴加时缓慢,约20~30min加完。然后室温下继续搅拌反应4~6h。

[0033] (3) 反应液装入透析袋内,用PBS (0.01mol/L pH7.4) 透析。每6~8h换液一次,共换液5~6次。透析后离心,弃沉淀,收上清液,-20℃保存。

[0034] 取1mg偶联物溶于1mL生理盐水中,与1mL完全弗氏佐剂混合,充分乳化后注射骆驼,以后每隔两周加强免疫一次,换成不完全弗氏佐剂与免疫原混合,颈背部皮下多点免疫,共免疫5次。从第三次免疫开始,每次免疫后一周从颈锁静脉采血检测血清效价。

[0035] 从第5次免疫后的外周血中分离白细胞,提取总RNA,经反转录PCR及巢式PCR,克隆出VHH基因片段(包含IgG2、IgG3a和IgG3b),用限制性内切酶Sfi I修饰粘性末端,通过T4连接酶将VHH基因片段连接至噬菌粒pComb3x,高效电转化至大肠杆菌ER2738,构建氟虫腓的噬菌体纳米抗体库。经测定,初级库容量达 10^8 cfu,加入辅助噬菌体(感染复数为20:1)M13K07进行拯救,得到噬菌体纳米抗体库,库容量为 10^{14} pfu/mL,库的多样性良好。

[0036] 反转录PCR:

[0037] 反转录试剂盒采用PrimeScript™ RT-PCR Kit,购自TaKaRa公司,商品编号:AK2701。

[0038] 反转录体系如下:

[0039]	试剂	体积
	dNTP (10mM)	1 μL
[0040]	GSP-RT	1 μL
	RNA 模板	8 μL

[0041] 65℃反应5min。取出置于冰上,按以下体系加样,进行cDNA第一链合成。

	试剂	体积
	反转录反应液	10 μL
[0042]	5×Primer Script Buffer	4 μL
	RNase Inhibitor	0.5 μL
	Primer Script RNase	0.5 μL
	RNase-free H ₂ O	5 μL

[0043] 30℃10min;42℃1h;72℃5min。

[0044] 巢式PCR:

[0045] 第一轮PCR:

[0046] 反应体系如下:

- | | 试剂 | 体积 |
|--------|--------------------------------|--------------|
| | cDNA | 2 μ L |
| | 10 \times Primer STAR Buffer | 5 μ L |
| [0047] | d NTP Mixture | 2 μ L |
| | 引物 GSP-RT(10 μ M) | 1 μ L |
| | 引物 LP-Leader (10 μ M) | 1 μ L |
| | Taq DNA 聚合酶 | 0.5 μ L |
| | RNase-free H ₂ O | 38.5 μ L |
- [0048] 反应程序如下:94 $^{\circ}$ C 预变性3min;94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 50s,25个循环;72 $^{\circ}$ C 5min。
- [0049] 第二轮PCR:
- [0050] 反应体系如下:
- | | 试剂 | 体积 |
|--------|--------------------------|-----------|
| | 第一轮 PCR 产物 | 5 μ L |
| [0051] | 10 \times PCR Buffer | 5 μ L |
| | d NTP Mixture | 2 μ L |
| | 引物 R1/R2/R5 (10 μ M) | 1 μ L |
| | 引物 F (10 μ M) | 1 μ L |
- | | | |
|--------|-----------------------------|--------------|
| [0052] | E-Taq DNA 聚合酶 | 0.5 μ L |
| | RNase-free H ₂ O | 35.5 μ L |
- [0053] 反应程序如下:94 $^{\circ}$ C 预变性3min;94 $^{\circ}$ C 30s,62 $^{\circ}$ C 40s,72 $^{\circ}$ C 40s,25个循环;72 $^{\circ}$ C 5min。
- [0054] 巢式PCR引物序列如下 (SEQ ID NO:2-7):
- [0055] GSP-RT:5' -CGCCATCAATRTACCAGTTGA-3'
- [0056] LP-leader:5' -GTGGTCCTGGCTGCTCTW-3'
- [0057] F:5' -CATGCCATGACTGTGGCCCGGCCAGKTGCAGCTCGTGGAGTC-3'
- [0058] R1:5' -CATGCCATGACTCGCGGCCGGCCTGGCCATGGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG-3'
- [0059] R2:5' -CATGCCATGACTCGCGGCCGGCCTGGCCGTCTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG-3'
- [0060] R5:5' -CATGCCATGACTCGCGGCCGGCCTGGCCCTTGCATACTTCATTCGTTCTG-3'
- [0061] 其中,R表示碱基A/G,W表示碱基A/T,K表示碱基G/T。
- [0062] 实施例3特异性氟虫腈噬菌体展示纳米抗体的筛选
- [0063] 在96孔酶标板的第1个孔包被实施例2的包被抗原,包被浓度为100 μ g/mL,4 $^{\circ}$ C过夜;次日,倒出包被液,用PBST洗涤3次,将酶标板第1、2两个孔用BSA封闭,37 $^{\circ}$ C孵育1h;倒出封闭液,用PBST洗涤3次;将实施例2的噬菌体抗体库加入第1个孔,反应2h;倒出液体,在洁净的吸水纸上拍干,用PBST洗涤5次;加100 μ L氟虫腈标准品到第1个孔中,反应1h;吸出第1个孔中的液体,加入第2个孔,反应1h,除去与BSA结合的噬菌体;收集洗脱液,取5 μ L用于滴

度测定,其余用于扩增。

[0064] 将噬菌体洗脱液加入新鲜的大肠杆菌ER2738菌液,37℃静置15min;加入羧苄青霉素(工作浓度50mg/L)和SB培养基,37℃220rpm振荡培养2h;加入辅助噬菌体M13K07(感染复数MOI=20:1)和卡那霉素,培养过夜;次日,离心取上清,加入PEG-NaCl溶液沉淀纯化噬菌体。

[0065] 将扩增产物进行下一轮筛选,保证每轮筛选加入量相同,抗原包被浓度及氟虫腈标准品竞争洗脱浓度按2倍递减,计算每轮的滴度,挑取单克隆进行扩增及ELISA鉴定。经3轮淘选得到阳性单克隆。

[0066] 实施例4特异性氟虫腈纳米抗体的表达

[0067] 提取阳性单克隆质粒,化转至大肠杆菌TOP10F'感受态细胞,复苏后涂布于固体培养基过夜培养。次日,挑取单个克隆于SB-羧苄培养基(羧苄青霉素工作浓度为50mg/L)中培养,加入IPTG诱导过夜表达;次日,用超声破碎仪裂解细胞,滤膜过滤后用镍柱纯化,即利用组氨酸标签与镍柱中氯化镍的亲层析对纳米抗体进行分离纯化,得到高纯度的抗氟虫腈纳米抗体,经氨基酸测序分析,所得纳米抗体F1的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0068] 实施例5分析氟虫腈残留的ELISA检测试剂盒及其应用

[0069] 所述试剂盒包括盒体、设在盒体内可拆卸的96孔酶标板以及设在盒体内的试剂。其中,所述酶标板的每个孔包被有实施例1的氟虫腈包被抗原,所述试剂包括实施例4的抗氟虫腈纳米抗体、氟虫腈标准溶液、酶标记的二抗、缓冲液PBS、洗涤液PBST、底物液(A液)、显色液(B液)和反应终止液等。

[0070] 酶标记的二抗为辣根过氧化物酶标记的抗HA标签抗体,浓度为0.1μg/mL。购自Abcam公司,商品编号:ab1265。

[0071] A液由过氧化脲1g、柠檬酸10.3g、Na₂HPO₄·12H₂O 35.8g、吐温-20 100μL和蒸馏水1000mL配制而成,pH值5。

[0072] B液由四甲基联苯胺700mg、DMSO 40mL、柠檬酸10.3g和蒸馏水1000mL配制而成,pH值2.4。

[0073] 反应终止液为2M的硫酸液。

[0074] 将包被抗原包被于96孔酶标板上,每个孔包被浓度为165ng/mL,4℃过夜反应;次日,甩出孔中的液体,用含0.05%吐温的PBST洗3次,将酶标板倒置在吸水纸上拍干;加入封闭液,37℃孵育30分钟,甩出孔中的液体,用0.05%PBST洗3次,将酶标板倒置在吸水纸上拍干;配制0ng/mL,1ng/mL,4ng/mL,12ng/mL,37ng/mL,111ng/mL,333ng/mL,1000ng/mL的氟虫腈标准液,加入50μL标样或处理好的样品到各孔中。对于水样,只需将其过滤后进行检测;对于蔬菜样品的前处理,参照“三唑磷残留检测直接竞争ELISA试剂盒的研制及应用,梁赤周等,中国食品学报,第8卷第6期,2008年12月,P103右栏第2段”进行,用稀释液溶解即可进行检测。标样和样品做2-4个重复,加入50μL稀释的抗体(稀释后浓度约为100ng/mL),37℃孵育30分钟;甩出孔中的液体,用PBST洗3次,将酶标板倒置在吸水纸上拍干;加入酶标二抗,37℃孵育30分钟;甩出孔中的液体,用PBST洗板3次,拍干;取A液和B液等体积混匀,每孔加100μL,避光显色10~15分钟,加入终止液终止反应,酶标仪上测定各孔在波长为450nm处的OD值。

[0075] 将含0ng/mL标准品孔的OD值减去含最大浓度标准品孔的OD值定为B₀,其余孔经同

样方法校正后的OD值定为B;以B/B₀值为纵坐标,相应标准品浓度为横坐标,绘制氟虫腈标准抑制曲线(图1)。根据曲线的回归方程可以求出对应样品的浓度,也可以求出氟虫腈抑制中浓度IC₅₀(B/B₀=50%)及最小检测限IC₁₀(B/B₀=90%)。

[0076] 实际样品检测过程中,酶标板孔壁上吸附的包被抗原(包被浓度为100ng/mL)和待测氟虫腈相互竞争与抗体反应,竞争结果通过显色反应出来。检测已知浓度的氟虫腈并绘制标准曲线,可以推算出待测氟虫腈的浓度。本发明的优点是能准确灵敏地检测水和蔬菜中氟虫腈残留,样品的前处理过程简单对于水样,只需将其过滤后进行检测;对于蔬菜样品的前处理,参见“三唑磷残留检测直接竞争ELISA试剂盒的研制及应用,梁赤周等,中国食品学报,第8卷第6期,2008年12月”。本方法耗时少,能同时检测大量的样品,样品检测成本远低于传统的仪器检测方法。

[0077] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 中国农业大学
 [0003] <120> 基于纳米抗体检测氟虫腈残留的ELISA试剂盒及其应用
 [0004] <130> KHP171112091.3
 [0005] <160> 7
 [0006] <170> PatentIn version 3.3
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 149
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> 人工序列
 [0011] <400> 1
 [0012] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 [0013] 1 5 10 15
 [0014] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Pro Ser Pro Val Thr Tyr Ser Ser Asn
 [0015] 20 25 30
 [0016] Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0017] 35 40 45
 [0018] Ala Ala Val Tyr Val Ser Gly Gly Gly Arg Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser
 [0019] 50 55 60
 [0020] Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Ala Asp Tyr Ala Lys Asn Thr Val
 [0021] 65 70 75 80
 [0022] Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
 [0023] 85 90 95
 [0024] Cys Ala Ala Asp Val Cys Arg Leu Pro Val Pro Val Tyr Gly Ala Ser
 [0025] 100 105 110
 [0026] Trp Arg Gly Tyr Gly Tyr Lys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 [0027] 115 120 125
 [0028] Val Ser Ser Gly Thr Asn Glu Val Cys Lys Gly Gln Ala Gly Gln His
 [0029] 130 135 140
 [0030] His His His His His
 [0031] 145
 [0032] <210> 2
 [0033] <211> 21
 [0034] <212> DNA
 [0035] <213> 人工序列
 [0036] <220>
 [0037] <221> misc_feature
 [0038] <222> (11) .. (11)

- [0039] <223> r为a或g
[0040] <400> 2
[0041] cgccatcaat rtaccagttg a 21
[0042] <210> 3
[0043] <211> 18
[0044] <212> DNA
[0045] <213> 人工序列
[0046] <220>
[0047] <221> misc_feature
[0048] <222> (18) .. (18)
[0049] <223> w为a或t
[0050] <400> 3
[0051] gtggtcctgg ctgctctw 18
[0052] <210> 4
[0053] <211> 47
[0054] <212> DNA
[0055] <213> 人工序列
[0056] <220>
[0057] <221> misc_feature
[0058] <222> (31) .. (31)
[0059] <223> k为g或t
[0060] <400> 4
[0061] catgcatga ctgtggcca ggcggcccag ktcagctcg tggagtc 47
[0062] <210> 5
[0063] <211> 51
[0064] <212> DNA
[0065] <213> 人工序列
[0066] <400> 5
[0067] catgcatga ctcgcgccg gcctggccat ggggtcttc gctgtggtgc g 51
[0068] <210> 6
[0069] <211> 52
[0070] <212> DNA
[0071] <213> 人工序列
[0072] <400> 6
[0073] catgcatga ctcgcgccg gcctggccgt cttgtggttt tgggtcttg gg 52
[0074] <210> 7
[0075] <211> 51
[0076] <212> DNA
[0077] <213> 人工序列

[0078] <400> 7

[0079] catgcatga ctcgcgccg gcctggcct tgcatacttc attcgttct g 51

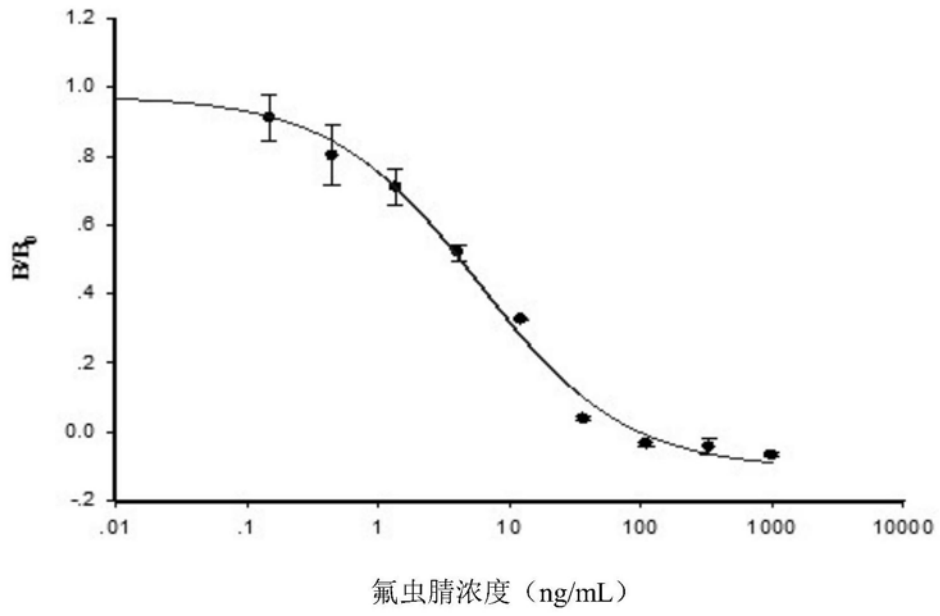


图1

专利名称(译)	一种适用于氟虫腈残留分析的VHH-ELISA试剂盒		
公开(公告)号	CN107557358B	公开(公告)日	2020-05-19
申请号	CN201710639958.9	申请日	2017-07-31
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	许艇 王楷 林优优 刘志平 李季 布鲁斯杜普里哈莫克		
发明人	许艇 王楷 林优优 刘志平 李季 布鲁斯·杜普里·哈莫克		
IPC分类号	C12N15/11 C12N15/10 C07K16/44 G01N33/58 G01N33/531		
代理人(译)	王文君 黄爽		
其他公开文献	CN107557358A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了基于纳米抗体检测氟虫腈残留的ELISA试剂盒及其应用，所述试剂盒包括盒体、设在盒体内的酶标板以及试剂；其中，酶标板的每个孔包被有氟虫腈包被抗原，所述试剂包括抗氟虫腈纳米抗体、氟虫腈标准溶液、酶标记的二抗、缓冲液PBS、洗涤液PBST、底物液、显色液和反应终止液等。检测过程中，酶标板孔壁上吸附的包被抗原和待测氟虫腈相互竞争与抗体反应，通过显色反应观察结果。本发明还提供一条用于构建骆驼科动物噬菌体展示纳米抗体文库的C端通用PCR引物。本发明的优点是能准确灵敏地检测水、蔬菜中氟虫腈残留，样品的前处理过程简单，耗时少，能同时检测大量的样品，样品检测成本远低于传统的仪器检测方法。

