



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107515298 B

(45)授权公告日 2019.10.01

(21)申请号 201710642183.0

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2017.07.31

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 106680484 A, 2017.05.17, 权利要求1-10, 说明书第6-17段、实施例1-6.

申请公布号 CN 107515298 A

审查员 贾静

(43)申请公布日 2017.12.26

(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 吴纱 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

11002

代理人 王文君 黄爽

(51)Int.Cl.

C07K 16/44(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

G01N 33/557(2006.01)

序列表2页 附图1页

(54)发明名称

基于纳米抗体检测甲萘威残留的ELISA试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了基于纳米抗体检测甲萘威残留的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甲萘威包被抗原,所述试剂包括抗甲萘威纳米抗体、甲萘威标准溶液、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甲萘威相互竞争与抗体反应,通过显色反应观察结果。检测已知浓度的甲萘威并绘制标准曲线,可以推算出待测甲萘威的浓度。本发明的优点是能准确灵敏地检测水、蔬菜中甲萘威残留,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. 抗甲萘威纳米抗体,其特征在於,所述抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 分析甲萘威残留的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甲萘威包被抗原,所述试剂包括权利要求1所述纳米抗体、甲萘威标准溶液、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,所述甲萘威包被抗原为半抗原N-(1-萘氧羰基)-6-氨基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) 将30.2mg N-(1-萘氧羰基)-6-氨基己酸、13.9mg N-羟基琥珀酰亚胺和24.3mg N,N'-二环己基碳二亚胺,溶于1mL无水二甲基甲酰胺中,室温下搅拌过夜反应;将反应液离心,弃沉淀,收集上清液;
 - (2) 将牛血清蛋白20mg溶于0.05M, pH 9.6的碳酸盐缓冲液2mL中,搅拌下逐滴加入所述上清液,加完后室温下继续搅拌反应4h;
 - (3) 反应结束后,将反应液装入透析袋内用PBS液透析;每6h换液一次,共换液5-6次;透析后离心,弃沉淀,收上清液,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100ng/mL。
5. 根据权利要求2-4任一项所述的试剂盒,其特征在於,所述纳米抗体的浓度为0.535ng/mL。
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0.1 μ g/mL。
7. 根据权利要求2-6任一项所述的试剂盒,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、Na₂HPO₄·12H₂O 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。
8. 根据权利要求2-7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。
9. 甲萘威ELISA检测试剂,其有效成分为权利要求1所述抗体。
10. 权利要求2-8任一项所述试剂盒或权利要求9所述试剂在ELISA法检测样品中甲萘威残留的应用。

基于纳米抗体检测甲萘威残留的ELISA试剂盒及其应用

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甲萘威残留的ELISA试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 甲萘威是一种氨基甲酸酯杀虫剂,这类农药残留的常规检测主要是应用仪器分析法,包括气相色谱法(GC)和高效液相色谱法(HPLC)等。这些分析方法所需的仪器价格昂贵,样品的分离、提取、净化、衍生等前处理复杂,分析速度慢、检测灵敏度低,难以满足现场快速检测需求。许多理化分析技术本身存在局限性,如甲萘威的热稳定性差,难于用气相色谱法分析,而液相色谱尚缺乏选择性好的高灵敏度检测器等。随着待检样品、特别是要求现场快速检测样品量的迅速增加,传统的农药残留分析手段难以适应要求。

[0003] 胆碱酯酶抑制法是利用有机磷和氨基甲酸酯类农药对胆碱酯酶的抑制作用原理而建立的一种农药残留检测方法,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,在0.1-10mg/L范围内,检测结果不稳定,难以满足痕量检测需求。因此,亟待开发一种高效农药残留快速分析技术。

[0004] 基于常规抗体(多克隆抗体和单克隆抗体)的甲萘威残留酶联免疫吸附分析方法稳定性相对较低,本发明以抗甲萘威纳米抗体为基础,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

[0005] 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缺点,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,分析甲萘威残留的ELISA检测试剂盒。适用于水、土壤等样品中甲萘威残留的快速测定。

[0006] 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。

[0007] 继而本发明提供一种抗甲萘威纳米抗体,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。

[0008] 所述抗甲萘威纳米抗体可以按如下方法进行制备:利用化学反应合成甲萘威的半抗原N-(1-萘氧羰基)-6-氨基己酸,将半抗原与钥孔血蓝蛋白偶联后作为免疫原,免疫实验动物羊驼,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,筛选出特异的甲萘威噬菌体纳米抗体,将其表达纯化,得到灵敏度高,特异性强的抗甲萘威纳米抗体。制备的纳米抗体分子小,可剪性强,耐高温,易纯化,易表达。

[0009] 本发明的分析甲萘威残留的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甲萘威包被抗原,所述试剂包括所述抗甲萘威纳米抗体、甲萘威标准溶液、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。

[0010] 所述甲萘威包被抗原为半抗原N-(1-萘氧羰基)-6-氨基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)将30.2mg N-(1-萘氧羰基)-6-氨基己酸、13.9mg N-羟基琥珀酰亚胺和24.3mg N,N'-二环己基碳二亚胺溶于1mL无水二甲基甲酰胺中,室温下搅拌过夜反应。将反应液离心(5000rpm,10min),弃沉淀,收集上清液,上清液中含有活性酯。(2)将牛血清蛋白20mg溶于0.05M,pH9.6的碳酸盐缓冲液2mL中,搅拌下逐滴加入所述上清液,滴加时缓慢,约20min加完。然后室温下继续搅拌反应4h。(3)反应结束后,将反应液装入透析袋内用PBS(0.01mol/L,pH 7.4)透析;每6h换液一次,共换液5-6次。透析后离心,弃沉淀,收上清液,作为抗原包被液。

[0011] 所述酶标板为96孔酶标板,包被抗原的包被浓度为100ng/mL。

[0012] 所述纳米抗体的浓度为0.535ng/mL。

[0013] 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,浓度为0.1μg/mL。购自Abcam公司,商品编号:ab1265。

[0014] 所述显色液A液由过氧化脲1g、柠檬酸10.3g、Na₂HPO₄·12H₂O35.8g、吐温-20 100μL和蒸馏水1000mL配制而成,pH值5。

[0015] 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。

[0016] 所述反应终止液为2M的硫酸液。

[0017] 本发明还提供提供一种甲萘威ELISA检测试剂,其有效成分为所述抗甲萘威纳米抗体。

[0018] 本发明进一步所述试剂盒或试剂在ELISA法检测样品中甲萘威残留的应用。分析检测时,向包被有所述甲萘威包被抗原的酶标板的各孔中依次加入待测甲萘威样品和所述抗甲萘威纳米抗体,固相包被抗原和待测甲萘威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,因此当待测的甲萘威浓度高时,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,当待测甲萘威浓度低时,则所测的OD值高,抑制率低。根据用已知浓度的甲萘威标准溶液检测所绘制标准曲线,即可推算出待测甲萘威的浓度。

[0019] 本发明的优点是能准确灵敏地检测水和土壤中甲萘威残留,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。本发明对解决大批量样品的甲萘威残留现场监控技术具有重要的现实意义。

附图说明

[0020] 图1为本发明实施例6中基于纳米抗体的甲萘威的标准抑制曲线。曲线回归方程为 $y=0.0248+0.9573/[1+(x/111.5121)^{0.9009}]$ ($R^2=0.995$)抑制中浓度 $IC_{50}=113.31ng/mL$,最低检测限 $IC_{10}=8.06ng/mL$ 。

具体实施方式

[0021] 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。

[0022] 实施例1半抗原N-(1-萘氧羰基)-6-氨基己酸的合成

[0023] 5.6g NaOH(0.139mol)溶于56mL蒸馏水中,加入20g α -萘酚(0.139mol)。混合物在85℃下搅拌反应1h,冷却至室温。在通风橱内缓慢加入过量的三光气(19.3g三光气和100mL甲苯),室温下搅拌反应1h。有机相用无水Na₂SO₄干燥,真空减压除去有机溶剂,得到棕色油状物质。将其溶于二氯甲烷,真空蒸馏(1mm Hg),收集100℃的馏分,得到13.7g淡黄色油状产物氯甲酸萘酯。

[0024] 称7.37g 6-氨基己酸(56.1mmol)溶于7.5mL、4mol/L的NaOH中,冷却至4℃。将6.25g氯甲酸萘酯(30.3mmol)溶于11mL 1,4-二氧杂环己烷中,冷却至4℃,然后与7.5mL 4mol/L冷NaOH混合,在冰浴中分5次等批量加入到6-氨基己酸碱液中,每次加入至少间隔5min,搅拌反应3h后,用浓盐酸将pH调至4。所得油状产物用乙酸乙酯萃取(3次,每次用量35mL),有机相用1mol/L的盐酸洗涤(2次,每次用量15mL),然后用1mol/L的NaHCO₃萃取(3次,每次用量50mL),萃取液最后在冰浴中用pH 3的浓盐酸酸化,得到黄色固体物。洗涤、重结晶,得4.8g干燥白色终产物N-(1-萘氧羰基)-6-氨基己酸。

[0025] 实施例2甲萘威包被抗原的制备

[0026] 以半抗原N-(1-萘氧羰基)-6-氨基己酸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:

[0027] (1)将30.2mg N-(1-萘氧羰基)-6-氨基己酸、13.9mg N-羟基琥珀酰亚胺和24.3mg N,N'-二环己基碳二亚胺溶于1mL无水二甲基甲酰胺中,室温下搅拌过夜反应。将反应液离心(5000rpm,10min),弃沉淀,收集上清液,上清液中含有活性酯。(2)将20mg牛血清蛋白溶于2mL 0.05M,pH 9.6碳酸盐缓冲液中,搅拌下逐滴加入所述上清液,滴加时缓慢,约20min加完。然后室温下继续搅拌反应4h。(3)反应结束后,将反应液装入透析袋内用PBS(0.01mol/L,pH 7.4)透析;每6h换液一次,共换液5-6次。透析后离心,弃沉淀,收上清液,作为抗原包被液。

[0028] 实施例3甲萘威噬菌体展示纳米抗体库的构建

[0029] 采用活性酯法将实施例1的半抗原与钥孔血蓝蛋白偶联,具体方法如下:

[0030] 将等摩尔量的N-(1-萘氧羰基)-6-氨基己酸、NHS和DCC溶于DMF中,室温下搅拌过夜反应。将反应液离心弃沉淀,上清液为活性酯。将上清液在搅拌状态下加入钥孔血蓝蛋白溶液中,室温下继续搅拌反应4h。反应液装入透析袋内用PBS透析。离心,收集上清,冷冻干燥后即得N-(1-萘氧羰基)-6-氨基己酸与钥孔血蓝蛋白的偶联物。

[0031] 取1mg偶联物溶于1mL生理盐水中,与1mL完全弗氏佐剂混合,充分乳化后注射羊驼,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。

[0032] 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,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,构建甲萘威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。

[0033] 反转录PCR:

[0034] 反转录试剂盒采用PrimeScript RT-PCR Kit,购自TaKaRa公司,商品编号:AK2701。

[0035] 反转录体系如下:

	dNTP (10mM)	1 μ L
[0036]	GSP-RT	1 μ L
	RNA	8 μ L

[0037] 65 $^{\circ}$ C,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 μ L
[0038]	5 \times Primer Script Buffer	4 μ L
	RNase Inhibitor	0.5 μ L
	Primer Script RNase	0.5 μ L
	RNase-free H ₂ O	5 μ L

[0039] 30 $^{\circ}$ C 10min; 42 $^{\circ}$ C 1h; 72 $^{\circ}$ C 5min。

[0040] 巢式PCR:

[0041] 第一轮PCR:

[0042] 反应体系如下:

	试剂	体积
[0043]	cDNA	2 μ L
	10 \times Primer STAR Buffer	5 μ L
	d NTP Mixture	2 μ L
	引物 GSP-RT(10 μ M)	1 μ L
[0044]	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

[0045] 反应程序如下:

94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;

[0046] $\left. \begin{array}{l} 94 \text{ }^{\circ}\text{C } 30 \text{ s} \\ 55 \text{ }^{\circ}\text{C } 30 \text{ s} \\ 72 \text{ }^{\circ}\text{C } 50 \text{ s} \end{array} \right\} 25 \text{ 个循环}$

72 $^{\circ}$ C 5 min。

[0047] 第二轮PCR:

[0048] 反应体系如下:

	试剂	体积
	第一轮 PCR 产物	5 μ L
	10 \times PCR Buffer	5 μ L
[0049]	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
	E-Taq DNA 聚合酶	0.5 μ L
	RNase-free H ₂ O	35.5 μ L

[0050] 反应程序如下:

94 °C 预变性 3min;

[0051] $\left. \begin{array}{l} 94\text{ }^{\circ}\text{C}\ 30\text{s} \\ 62\text{ }^{\circ}\text{C}\ 40\text{s} \\ 72\text{ }^{\circ}\text{C}\ 40\text{s} \end{array} \right\} 25\text{ 个循环}$

72 °C 延伸 5 min。

[0052] 巢式PCR引物序列如下 (SEQ ID NO:2-7):

[0053] GSP-RT:5' -CGCCATCAATRTACCAGTTGA-3'

[0054] LP-leader:5' -GTGGTCCTGGCTGCTCTW-3'

[0055] F:5' -CATGCCATGACTGTGGCCAGGCGGCCAGKTGCAGCTCGTGGAGTC-3'

[0056] R1:5' -CATGCCATGACTCGCGGCCGGCCTGGCCATGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG-3'

[0057] R2:5' -CATGCCATGACTCGCGGCCGGCCTGGCCGCTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG-R'

[0058] R5:5' -CATGCCATGACTCGCGGCCGGCCTGGCCCTTGCATACTTCATTCGTTCTTG-3'

[0059] 其中,R表示碱基A/G,W表示碱基A/T,K表示碱基G/T。

[0060] 实施例4特异性甲萘威噬菌体展示纳米抗体的筛选

[0061] 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3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甲萘威标准品到第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。

[0062] 将噬菌体洗脱液加入新鲜的大肠杆菌ER2738菌液,37 $^{\circ}$ C,静置15min;加入羧苄青霉素(工作浓度50mg/L)和SB培养基,37 $^{\circ}$ C,220rpm,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。

[0063] 将扩增产物进行下一轮筛选,保证每轮筛选加入量相同,抗原包被浓度及甲萘威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4轮淘选得到阳性单克隆。

[0064] 实施例5特异性甲萘威纳米抗体的表达

[0065] 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,得到高纯度的抗甲萘威纳米抗体,经氨基酸测序分析,所得纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0066] 实施例6分析甲萘威残留的ELISA检测试剂盒及其应用

[0067] 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2的甲萘威包被抗原,所述试剂包括实施例5的抗甲萘威纳米抗体、甲萘威标准溶液、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。

[0068] 抗甲萘威纳米抗体的浓度为0.535ng/mL。

[0069] 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0.1 μ g/mL。购自Abcam公司,商品编号:ab1265。

[0070] 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。

[0071] 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。

[0072] 反应终止液为2M的硫酸液。

[0073] 将包被抗原包被于96孔酶标板上,每个孔包被浓度为100 μ g/mL,4 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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的甲萘威标准液,加入50 μ L标样或处理好的样品到各孔中,标样和样品做2-4个重复,加入50 μ L稀释的抗体,37 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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100 μ L,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。

[0074] 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 B_0 ,其余孔经同样方法校正后的OD值定为B;以 B/B_0 值为纵坐标,相应标准品浓度为横坐标,绘制甲萘威标准抑制曲线(图1)。根据曲线的回归方程可以求出对应样品的浓度,也可以求出甲萘威抑制中浓度 IC_{50} ($B/B_0=50\%$)及最小检测限 IC_{10} ($B/B_0=90\%$)。

[0075] 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)和待测甲萘威相互竞争与抗体反应,竞争结果通过显色反应出来。检测已知浓度的甲萘威并绘制标准曲线,可以推算出待测甲萘威的浓度。本发明的优点是能准确灵敏地检测水、土壤和蔬菜中甲萘威残留,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。

[0076] 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,可以对之作一些修改或改进,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> 基于纳米抗体检测甲萘威残留的ELISA试剂盒及其应用
 [0004] <130> KHP1711113357.9
 [0005] <160> 7
 [0006] <170> PatentIn version 3.3
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 144
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> 人工序列
 [0011] <400> 1
 [0012] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Ala
 [0013] 1 5 10 15
 [0014] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Asp Ser Cys His
 [0015] 20 25 30
 [0016] Ala Val Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Leu
 [0017] 35 40 45
 [0018] Ala Ala Ile Ser Cys Ser Gly Arg Thr Thr Asp Tyr Ala Gly Ser Val
 [0019] 50 55 60
 [0020] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Ser Asn Ala Met Lys Thr Ala Tyr
 [0021] 65 70 75 80
 [0022] Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0023] 85 90 95
 [0024] Ala Ala Thr Arg Leu Leu Leu Gly Ile Pro Ala Thr Thr Gly Tyr Asn
 [0025] 100 105 110
 [0026] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Thr
 [0027] 115 120 125
 [0028] Pro Lys Pro Gln Gly Gly Gln Ala Gly Gln His His His His His His
 [0029] 130 135 140
 [0030] <210> 2
 [0031] <211> 21
 [0032] <212> DNA
 [0033] <213> 人工序列
 [0034] <220>
 [0035] <221> misc_feature
 [0036] <222> (11) .. (11)
 [0037] <223> r为a或g
 [0038] <400> 2

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

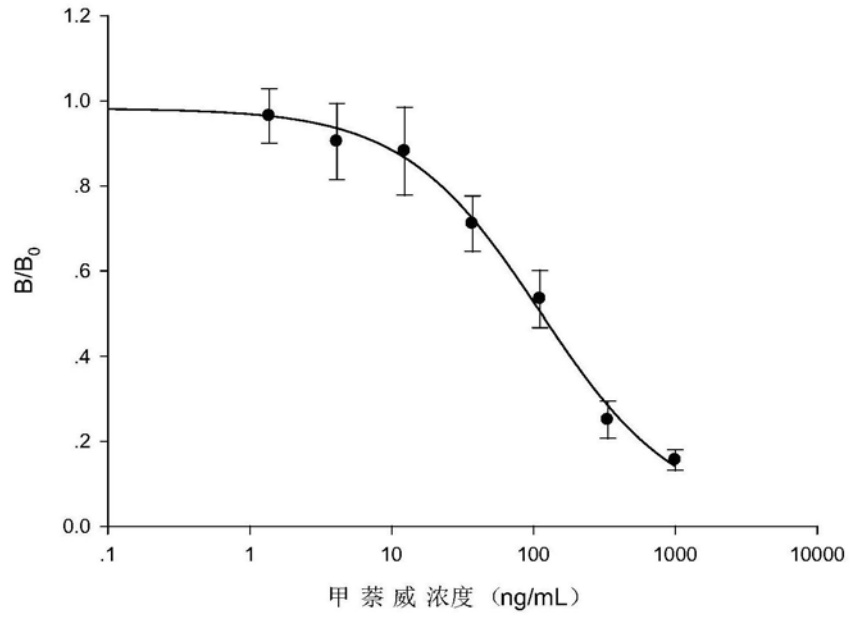


图1

专利名称(译)	基于纳米抗体检测甲萘威残留的ELISA试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN107515298B	公开(公告)日	2019-10-01
申请号	CN201710642183.0	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 吴纱 刘志平 李季 布鲁斯杜普里哈莫克		
发明人	许艇 王楷 吴纱 刘志平 李季 布鲁斯·杜普里·哈莫克		
IPC分类号	C07K16/44 G01N33/557 G01N33/531		
代理人(译)	王文君 黄爽		
审查员(译)	贾静		
其他公开文献	CN107515298A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了基于纳米抗体检测甲萘威残留的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甲萘威包被抗原，所述试剂包括抗甲萘威纳米抗体、甲萘威标准溶液、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甲萘威相互竞争与抗体反应，通过显色反应观察结果。检测已知浓度的甲萘威并绘制标准曲线，可以推算出待测甲萘威的浓度。本发明的优点是能准确灵敏地检测水、蔬菜中甲萘威残留，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。

dNTP (10mM)

1 μ L

GSP-RT

1 μ L

RNA

8 μ L