



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105319365 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 10

(21) 申请号 201410319595. 7

(22) 申请日 2014. 07. 07

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯国家科技园 B11 栋 3 楼

(72) 发明人 杜道林 戴蔚蔚 薛永来

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种快速检测农作物中苯达松含量的试剂盒

(57) 摘要

一种快速检测农作物中苯达松含量的试剂盒。本发明为检测苯达松的 ELISA 试剂盒的制备及其检测方法,其检测灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的检测。苯达松检测试剂盒的原理是固相间接竞争酶联免疫反应,把提取的样品、酶标二抗工作液和抗体工作液加入对应的酶标孔中,孵育一段时间后,洗板加入底物液 A、底物液 B,在酶的作用下孔里将会出现蓝色,加入终止液,颜色由蓝色变为黄色。显色的深浅与标准品或样品中苯达松的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测农作物(大豆、水稻、小麦、大麦等)中的苯达松含量。

1. 检测苯达松的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,包括苯达松酶标板、苯达松标准品、苯达松抗体工作液、苯达松酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液、浓缩样品稀释液和浓缩洗涤液。

2. 检测苯达松的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,包括以下步骤:苯达松酶标板的制备、苯达松标准品的制作、苯达松单克隆抗体及其工作液的制备、苯达松酶标二抗工作液的制备、洗涤液的制备、底物液 A 的制备、底物液 B 的制备、终止液的制备、浓缩样品稀释液的制备。

3. 根据权利要求 2 所述的检测苯达松的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的苯达松包被抗原是将苯达松半抗原与载体蛋白偶联得到的,该载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA);用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将苯达松抗原稀释成 1:20000 比例,100  $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C 放置 2 h,取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液 300  $\mu$ L/孔,洗板 2 次,30 s/次;然后加入 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)封闭,150  $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C 放置 1.5 h,弃去封闭液,拍干后的酶标板放置恒温间(25 $^{\circ}$ C)晾干;抽检合格后将酶标板真空密封后置 4 $^{\circ}$ C 下保存。

4. 根据权利要求 2 所述的检测苯达松的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的苯达松标准品浓度分别为 0 ng/mL、0.5 ng/mL、1.5 ng/mL、4.5 ng/mL、13.5 ng/mL、40.5 ng/mL。

5. 根据权利要求 2 所述的检测苯达松的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的苯达松抗体工作液是采用苯达松人工抗原免疫小鼠得到单克隆抗体,用抗体稀释液稀释成 1:50000 比例制备。

6. 根据权利要求 2 所述的检测苯达松的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的苯达松酶标二抗工作液用酶标二抗稀释液稀释成 1:5000 比例;所述底物液 A 为含有 0.5 mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;所述底物液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述终止液为 2 mol/L 的硫酸;所述浓缩洗涤液是 10 倍浓缩洗涤液,其包含 0.5% 吐温-20,0.01 mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间。

7. 权利要求 2 所述的检测苯达松的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,基于抗原抗体进行间接竞争酶联免疫反应,该方法包括以下步骤:

(1) 预处理待测样品,即将待测试的样品处理为液体样品,或者用有机溶剂提取待测样品,并将其复溶于样品稀释液工作液中;

(2) 将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温(20~25 $^{\circ}$ C)平衡 30 min 以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀;

(3) 取包被有苯达松抗原的酶标板,加标准品/样本 50  $\mu$ L/孔到对应的微孔中;

(4) 加入苯达松酶标二抗工作液,50  $\mu$ L/孔,然后加入苯达松抗体工作液,50  $\mu$ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温 25 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 30 min;

(5) 小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液 250  $\mu$ L/孔,充分洗涤 4~5 次,每次间隔 10 s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破);

(6) 加入底物液 A 50  $\mu$ L/孔,底物液 B 50  $\mu$ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 15min;

(7) 加入终止液 50  $\mu$ L/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于 450 nm 处或双波长 450/630

nm 检测,测定每孔吸光度值(请在 5 min 内读完数据);

(8) 以标准品测试的吸光度值与标准品的浓度对数值绘制标准曲线,对照标准曲线计算样品中苯达松的含量。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中,所述处理后的样品是经过以下处理的样品:

- (1) 配制乙腈 - 水溶液(体积比为 1:1);
- (2) 研磨代表性样品(使 50% 的样品可以通过一个 20 目的滤网);
- (3) 称量 20 g 研磨过滤后的样品加入 40 mL 乙腈 - 水溶液,样品稀释比为 1:2(w/v);
- (4) 在密封的容器里混合,震荡涡旋 1 min;
- (5) 室温离心 4000r/min 以上,10min;取 1ml 上清液到离心管中,50 ~60 °C 水浴氮气吹干;
- (6) 加入 1 mL 稀释后的样品稀释液充分振荡混合 30 s,混匀待测。

## 一种快速检测农作物中苯达松含量的试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术领域,特别是检测苯达松的酶联免疫试剂盒。

### 背景技术

[0002] 苯达松为内吸、传导型芽后除草剂,是一种苯并噻二唑(简称BTH)类除草剂,又名灭草松、排草丹,对绝大多数双子叶植物(除大豆、花生外)和莎草科杂草有杀除作用,对禾本科植物无害,可用于水稻、小麦等多种农作物田间除草。苯达松在抗性植物中的代谢过程,一般认为首先将苯达松还原成为6-OH苯达松或8-OH苯达松,再将6-OH苯达松或8-OH苯达松叠合形成6-OH葡萄糖苷苯达松或8-OH葡萄糖苷苯达松,从而将有毒性、易转移的物质转变成为无毒性、难转移的甙类。

[0003] 目前,苯达松的测定方法主要有高效液相色谱法、气相色谱法等,其检测结果准确可靠,但仪器设备比较昂贵,且样本前处理过程相对复杂。酶联免疫吸附法是一种准确、可靠、快速、特异的检测方法,适合于大批样品的快速筛选,近年来已广泛应用于农产品安全检测行业。本发明旨在建立一种检测苯达松的酶联免疫试剂盒及其检测方法。

### 发明内容

[0004] 为了克服色谱法的不足,本发明提供一种检测苯达松的酶联免疫试剂盒及其检测方法。该方法灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的快速检测。

[0005] 本发明检测苯达松的酶联免疫试剂盒,包括苯达松酶标板、苯达松标准品、苯达松抗体工作液、苯达松酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液。

[0006] 本发明检测苯达松的酶联免疫试剂盒的制备,包括以下步骤:酶标板的制备、苯达松标准品的制备、苯达松抗体工作液的制备、苯达松酶标二抗工作液的制备、底物液A的制备、底物液B的制备、终止液的制备、浓缩稀释液的制备和浓缩洗涤液的制备。

[0007] 苯达松包被抗原是将苯达松半抗原与载体蛋白偶联得到的,该载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA);用0.05 mol/L pH 9.6的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将苯达松抗原稀释成1:20000比例,100  $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C放置2 h,取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液300  $\mu$ L/孔,洗板2次,30 s/次;然后加入0.5%牛血清白蛋白(BSA)封闭,150  $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C放置1.5 h,弃去封闭液,拍干后的酶标板放置恒温间(25 $^{\circ}$ C)晾干;抽检合格后将酶标板真空密封后置4 $^{\circ}$ C下保存。

[0008] 苯达松标准品浓度分别为0 ng/mL、0.5 ng/mL、1.5 ng/mL、4.5 ng/mL、13.5 ng/mL、40.5 ng/mL。

[0009] 苯达松抗体工作液是采用苯达松人工抗原免疫小鼠得到单克隆抗体,用抗体稀释液稀释成1:50000比例制备。

[0010] 苯达松酶标二抗工作液用酶标二抗稀释液稀释成1:5000比例;底物液A为含有0.5 mmol/L的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;底物液B为四甲基联苯二胺

的乙醇溶液；终止液为 2 mol/L 的硫酸；浓缩洗涤液是 10 倍浓缩洗涤液，其包含 0.5% 吐温 -20, 0.01 mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间。

[0011] 苯达松的 ELISA 试剂盒的检测方法包括以下步骤：

(1) 预处理待测样品，即将待测试的样品处理为液体样品，或者用有机溶剂提取待测样品，并将其复溶于样品稀释液工作液中；

(2) 将所需试剂从冷藏环境中取出，置于室温 (20 ~ 25℃) 平衡 30 min 以上，注意每种液体试剂使用前均须摇匀；

(3) 取包被有苯达松抗原的酶标板，加标准品 / 样本 50  $\mu$  L / 孔到对应的微孔中；

(4) 加入苯达松酶标二抗工作液，50  $\mu$  L / 孔，然后加入苯达松抗体工作液，50  $\mu$  L / 孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置室温 25℃ 避光环境中反应 30 min；

(5) 小心揭开盖板膜，将孔内液体甩干，用洗涤工作液 250  $\mu$  L / 孔，充分洗涤 4~5 次，每次间隔 10 s，用吸水纸拍干（拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破）；

(6) 加入底物液 A 50  $\mu$  L / 孔，底物液 B 50  $\mu$  L / 孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置 25℃ 避光环境中反应 15min；

(7) 加入终止液 50  $\mu$  L / 孔，轻轻振荡混匀，设定酶标仪于 450 nm 处或双波长 450/630 nm 检测，测定每孔吸光度值（请在 5 min 内读完数据）；

(8) 以标准品测试的吸光度值与标准品的浓度对数值绘制标准曲线，对照标准曲线计算样品中苯达松的含量。

[0012] 待测样品用以下方法进行预处理：

(1) 配制乙腈 - 水溶液（体积比为 1:1）；

(2) 研磨代表性样品（使 50% 的样品可以通过一个 20 目的滤网）；

(3) 称量 20 g 研磨过滤后的样品加入 40 mL 乙腈 - 水溶液，样品稀释比为 1:2 (w/v)；

(4) 在密封的容器里混合，震荡涡旋 1 min；

(5) 室温离心 4000r/min 以上，10min；取 1ml 上清液到离心管中，50 ~ 60 °C 水浴氮气吹干；

(6) 加入 1 mL 稀释后的样品稀释液充分振荡混合 30 s，混匀待测。

## 附图说明

[0013] 图 1 为苯达松的标准曲线。

## 具体实施方式

[0014] 苯达松蛋白质偶联物的制备：

采用琥珀酸酐法得到带羧基的苯达松半抗原衍生物，之后取 0.05 mmol 与载体蛋白 BSA 按 10:1 的结合比混合在 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液 (CBS) 中，然后加入 0.15 mmol 碳二亚胺，搅拌置室温反应 24 h，最后于 0.2 mol/L pH 7.6 的 PBS 缓冲液中透析两天，除去未反应的半抗原，将得到的蛋白质偶联物溶液于 -20℃ 保存备用。

[0015] 苯达松抗体的制备：

选用健康成年纯种 BALB/C 小鼠，取与蛋白质偶联制备的免疫抗原 50  $\mu$  g 与等量完全弗氏佐剂混合采用腹腔注射进行初次免疫，之后每隔 3 周用相同剂量免疫抗原加等量不完全

弗氏佐剂采用腹腔注射进行二次、三次免疫,每次免疫 6 天后尾静脉采血测定抗血清效价至一定滴度后,用相同剂量不加佐剂进行末次免疫,3 天后取脾制备脾细胞悬浮液与骨髓瘤细胞进行细胞融合,筛选出所需要的杂交瘤细胞系进行克隆化,选择处于对数生长期的杂交瘤细胞进行冻存,用于腹水制备,先腹腔注射 0.5 mL 液体石蜡于 BALB/C 鼠致敏,2 周后腹腔注射  $1 \times 10^6$  个杂交瘤细胞,接种细胞 7-10 天后可产生腹水,待腹水尽可能多时用注射器抽取腹水,反复收集数次,4000 rpm 离心 15 min,收集上清,采用辛酸-硫酸铵法纯化腹水对单克隆抗体进行纯化,冷冻干燥得冻干粉后于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

[0016] 制备包被有苯达松包被抗原的酶标板:

苯达松包被抗原是将苯达松半抗原与载体蛋白偶联得到的,该载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA);用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将苯达松抗原稀释成 1:20000 比例,100  $\mu\text{L}$  / 孔,37 $^{\circ}\text{C}$  放置 2 h,取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液 300  $\mu\text{L}$  / 孔,洗板 2 次,30 s/次;然后加入 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)封闭,150  $\mu\text{L}$  / 孔,37 $^{\circ}\text{C}$  放置 1.5 h,弃去封闭液,拍干后的酶标板放置恒温间(25 $^{\circ}\text{C}$ )晾干;抽检合格后将酶标板真空密封后置 4 $^{\circ}\text{C}$  下保存。

[0017] 苯达松标准品配制浓度分别为 0 ng/mL、0.5 ng/mL、1.5 ng/mL、4.5 ng/mL、13.5 ng/mL、40.5 ng/mL。

[0018] 苯达松抗体工作液是采用苯达松人工抗原免疫小鼠得到单克隆抗体,用抗体稀释液稀释成 1:50000 比例制备。

[0019] 苯达松酶标二抗工作液用酶标二抗稀释液稀释成 1:5000 比例;底物液 A 为含有 0.5 mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;底物液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;终止液为 2 mol/L 的硫酸;浓缩洗涤液是 10 倍浓缩洗涤液,其包含 0.5% 吐温-20,0.01 mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间。

[0020] 基于上述制备的试剂,本发明用于检测苯达松的酶联免疫试剂盒包括如下材料:

- (1) 96 孔酶标板  $\times$  1 块;
- (2) 标准液  $\times$  6 瓶:(1mL/瓶) 0 ng/mL、0.5 ng/mL、1.5 ng/mL、4.5 ng/mL、13.5 ng/mL、40.5 ng/mL;
- (3) 抗体工作液 7 mL;
- (4) 酶标二抗工作液 7 mL;
- (5) 底物液 A 7 mL;
- (6) 底物液 B 7 mL;
- (7) 终止液 7 mL;
- (8) 10 $\times$  浓缩稀释液 40 mL;
- (9) 10 $\times$  浓缩洗涤液 40 mL。

[0021] 本发明的试剂盒用于检测样品中苯达松残留量时,通过以下步骤实施:样品预处理、用本发明试剂盒进行检测、分析结果。

[0022] (1) 样品预处理

称量 20 g 研磨过滤后的样品加入 40 mL 乙腈-甲醇溶液,在密封的容器里混合,震荡涡旋 1 min;室温离心 4000r/min 以上,10min;取 1ml 上清液;以 1:9 的比例稀释上清液,混匀待测。

**[0023] (2) 用本发明试剂盒检测待测样品中苯达松残留量**

取包被有苯达松抗原的酶标板,加标准品/样本 50 $\mu$ L/孔到对应的微孔中;加入酶标二抗工作液,50 $\mu$ L/孔,然后加入苯达松抗体工作液,50 $\mu$ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温 25 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 30 min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液 250  $\mu$  L/孔,充分洗涤 4~5 次,每次间隔 10 s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破);加入底物液 A 50  $\mu$  L/孔,底物液 B 50  $\mu$  L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 15 min;加入终止液 50  $\mu$  L/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于 450 nm 处或双波长 450/630 nm 检测,测定每孔吸光度值(请在 5 min 内读完数据);对比待测样品与标准品的吸光度值大小,定量分析待测样品中苯达松残留量。

**[0024] (3) 分析结果**

百分吸光度值的计算,标准品或样本的百分吸光度值等于标准品或样本的吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准(0 标准)的吸光度值,再乘以 100%,即

$$\text{百分吸光度值}(\%) = B/B_0 \times 100\%$$

其中 B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值,  $B_0$ —0 ppb 标准溶液的平均吸光度值。

**[0025]** 以苯达松的标准品浓度(ppb)的对数为横坐标,标准品百分吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,求出直线方程。将样本的百分吸光度值代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中苯达松的实际浓度。

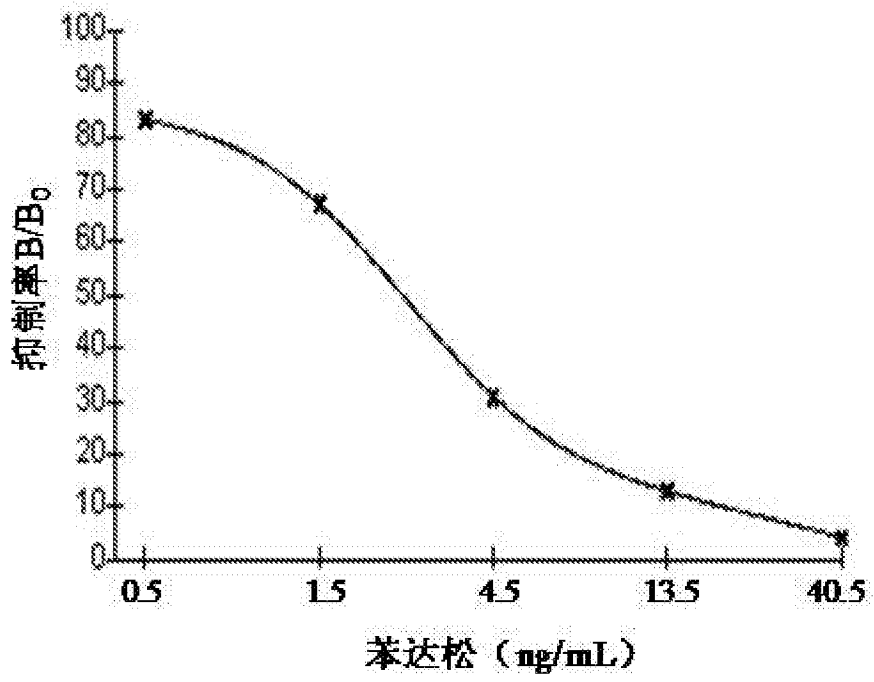


图 1

专利名称(译)	一种快速检测农作物中苯达松含量的试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN105319365A</a>	公开(公告)日	2016-02-10
申请号	CN201410319595.7	申请日	2014-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	杜道林 戴蔚蔚 薛永来		
发明人	杜道林 戴蔚蔚 薛永来		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种快速检测农作物中苯达松含量的试剂盒。本发明为检测苯达松的ELISA试剂盒的制备及其检测方法，其检测灵敏、准确、快速，操作简便、特异性强，适用于大批样品的检测。苯达松检测试剂盒的原理是固相间接竞争酶联免疫反应，把提取的样品、酶标二抗工作液和抗体工作液加入对应的酶标孔中，孵育一段时间后，洗板加入底物液A、底物液B，在酶的作用下孔里将会出现蓝色，加入终止液，颜色由蓝色变为黄色。显色的深浅与标准品或样品中苯达松的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测农作物（大豆、水稻、小麦、大麦等）中的苯达松含量。

