



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104977403 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 14

(21) 申请号 201510394552. X

(22) 申请日 2015. 07. 07

(71) 申请人 环境保护部南京环境科学研究所
地址 210042 江苏省南京市玄武区蒋王庙街
8号

(72) 发明人 程燕 焦少俊 姜锦林 卜元卿
周军英 单正军

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

代理人 肖明芳

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 1/28(2006. 01)

权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

检测噻虫啉的 ELISA 试剂盒及其制备方法与
应用

(57) 摘要

本发明公开了一种检测噻虫啉的 ELISA 试剂盒,它包括:用噻虫啉包被抗原包被的酶标板、噻虫啉标准品、噻虫啉多克隆抗体工作液、噻虫啉酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液和浓缩洗涤液。本发明还公开了上述试剂盒的制备方法与应用。本发明的试剂盒,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。

1. 一种检测噻虫啉的 ELISA 试剂盒,其特征在于,它包括:用噻虫啉包被抗原包被的酶标板、噻虫啉标准品、噻虫啉多克隆抗体工作液、噻虫啉酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液和浓缩洗涤液。

2. 根据权利要求 1 所述的检测噻虫啉的 ELISA 试剂盒,其特征在于,所述的噻虫啉包被抗原包被的酶标板按如下方法制备得到:将噻虫啉半抗原与卵清白蛋白偶联得到噻虫啉包被抗原附着于酶标板中。

3. 根据权利要求 1 所述的检测噻虫啉的 ELISA 试剂盒,其特征在于,所述的噻虫啉标准品,其溶质噻虫啉的浓度分别为 4096ng/ml、2048ng/mL、1024ng/mL、512ng/mL、256ng/mL、128ng/mL、64ng/mL、32ng/mL、16ng/mL、8ng/mL、4ng/mL、2ng/mL、1ng/mL、0ng/mL,溶剂为水。

4. 根据权利要求 1 所述的检测噻虫啉的 ELISA 试剂盒,其特征在于,所述的噻虫啉多克隆抗体工作液是采用噻虫啉人工抗原免疫兔制得噻虫啉多克隆抗体,再将噻虫啉多克隆抗体用稀释液按体积比稀释成 1:3200 的比例,所述的稀释液为含 5mg/ml BSA 的 PBS 溶液。

5. 根据权利要求 1 所述的检测噻虫啉的 ELISA 试剂盒,其特征在于,所述的噻虫啉酶标二抗工作液是将酶标二抗用稀释液按体积比稀释成 1:5000 的比例,所述的稀释液为含 5mg/ml BSA 的 PBS 溶液。

6. 根据权利要求 1 所述的检测噻虫啉的 ELISA 试剂盒,其特征在于,所述的底物液 A 为含有 0.5mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;所述的底物液 B 为 2mg/ml 的四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述的终止液为 2mol/L 的硫酸水溶液;所述浓缩洗涤液是 10 倍浓缩洗涤液,所述浓缩洗涤液为 0.01mol/L、pH 7.0 ~ 7.5 的 PBST。

7. 权利要求 1 所述的检测噻虫啉的 ELISA 试剂盒的制备方法,其特征在于,它包括如下步骤:

(1) 用噻虫啉包被抗原包被的酶标板的制备:

将噻虫啉半抗原与卵清白蛋白偶联得到噻虫啉包被抗原;将噻虫啉包被抗原稀释成 0.25 μg/ml,100 μL/孔在酶标板上点样,4, °C 过夜;取出酶标板甩掉板内液体,用 10 倍稀释后的浓缩洗涤液 300 μL/孔洗板 3 次,30s/次;然后加入含 5mg/ml BSA 的 PBS 溶液封闭,380 μL/孔在上述酶标板上点样,37°C 放置 2h,用 10 倍稀释后的浓缩洗涤液 300 μL/孔洗板 3 次,30s/次,拍干;将酶标板真空密封后置 4°C 下保存;

(2) 噻虫啉标准品的制备:

称取 0.0004g 噻虫啉标准品,用蒸馏水定容至 100mL,得到浓度为 4096ng/mL 的母液,依次按二倍比稀释,分别得到浓度为 2048ng/mL、1024ng/mL、512ng/mL、256ng/mL、128ng/mL、64ng/mL、32ng/mL、16ng/mL、8ng/mL、4ng/mL、2ng/mL、1ng/mL 的标准品溶液,同时补充空白 0ng/mL 的标准品溶液;

(3) 噻虫啉多克隆抗体工作液的制备:

采用噻虫啉人工抗原免疫兔制得噻虫啉多克隆抗体,将噻虫啉多克隆抗体用稀释液按体积比稀释成 1:3200 的比例即得,所述的稀释液为含 5mg/ml BSA 的 PBS 溶液;

(4) 噻虫啉酶标二抗工作液的制备:

将酶标二抗用稀释液按体积比稀释成 1:5000 的比例,所述的稀释液为含 5mg/ml BSA 的 PBS 溶液;

(5) 底物液 A 和底物液 B 的制备:

所述的底物液 A 为含有 0.5mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸 - 磷酸氢二钠缓冲溶液；

所述的底物液 B 为 2mg/ml 四甲基联苯二胺的乙醇溶液；

(6) 终止液的制备：

2mol/L 的硫酸水溶液；

(7) 浓缩洗涤液的制备：

0.01mol/L 的 PBST。

8. 权利要求 1 所述的检测噻虫啉的 ELISA 试剂盒在检测噻虫啉中的应用。

9. 根据权利要求 8 所述的应用,其特征在於,所述的噻虫啉为存在于土壤中的噻虫啉,噻虫啉在土壤中的含量为 0.001 $\mu\text{g/ml}$ ~ 4.096 $\mu\text{g/ml}$ 。

10. 根据权利要求 8 所述的应用,其特征在於,该方法包括以下步骤：

(a) 预处理待测样品,将待测试的样品处理为液体样品,并将其复溶于稀释液中,所述的稀释液为含 5mg/ml BSA 的 PBS 溶液；

(b) 将试剂盒中的所有试剂从冷藏环境中取出,置于室温条件下平衡 30min 以上,每种试剂使用前须摇匀；

(c) 取用噻虫啉包被抗原包被的酶标板,加入预处理后的待测样品或标准品和噻虫啉多克隆抗体工作液按体积比 1:1 的预混液,每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 2h,PBST 洗涤 3 次,拍干；

(d) 向步骤 (c) 得到的酶标板中加入噻虫啉酶标二抗工作液,每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1h,PBST 洗涤 3 次,拍干；

(e) 向步骤 (d) 得到的酶标板中加入底物液 A 50 μL /孔,底物液 B 50 μL /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应 5min；

(f) 向步骤 (e) 得到的酶标板中加入终止液 50 μL /孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于 450nm 处或双波长 450/630nm 检测,测定每孔吸光度值,在 5min 内读完数据；

(g) 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噻虫啉的含量。

11. 根据权利要求 10 所述的应用,其特征在於,将待测试的样品处理为液体样品,具体按照如下步骤处理：

(I) 配制浸提液:使用质量比为 2:1 的浓硫酸和浓硝酸混合液调节蒸馏水的 pH 值为 3.20 \pm 0.05；

(II) 将待测试样品研磨、破碎,过 9.5mm 筛；

(III) 称取经过步骤 (II) 处理后的样品 50 ~ 100g 置于具盖容器中,于 105 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干,恒重至两次称量值的误差小于 $\pm 1\%$,计算样品含水率；

(IV) 称取经过步骤 (III) 处理后的样品 150 ~ 200g,置于 2L 具旋盖和内盖的广口瓶中,根据样品的含水量,按液固比为 10L:1kg 计算出所需浸提液的体积,加入浸提液,盖紧瓶盖后固定在翻转式振荡装置上,调节转速为 30 \pm 2r/min,于 23 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡 18 \pm 2h,振荡过程中定时打开提取瓶,释放过度的压力；

(V) 在压力过滤器上装好 0.45 μm 滤膜,用稀硝酸淋洗过滤器和滤膜,弃去淋洗液,过滤并收集滤液；

(VI) 用 6mol/L 盐酸溶液调节步骤 (V) 得到的滤液 pH 值至 6.0 \pm 0.05,待测。

检测噻虫啉的 ELISA 试剂盒及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于检测技术领域,具体涉及一种用于定量检测噻虫啉残留量的酶联免疫试剂盒及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 酶联免疫分析法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)作为新兴的农药残留检测方法,具有特异性强、灵敏度高、操作简便、检测快速、投入少、测定结果可靠等优点。美国化学学会(AOAC)已将免疫分析与气相色谱、液相色谱同列为农药残留检测的三大支柱技术。美国环境保护署(USEPA)、美国农业部食品安全检验司(FSIS-USDA)和美国化学学会制定了农药残留免疫检验商品试剂盒评定和认可的建议准则,明确了测定结果的法律效力。自从 Hammock 等首次将免疫技术用于农药残留分析以来,已有几十余种农药建立了酶联免疫分析方法,几乎包括了杀虫剂、杀菌剂、除草剂、植物(昆虫)生长调节剂等所有农药类别,其中杀虫剂有对硫磷、亚胺硫磷、甲基对硫磷、杀螟硫磷、甲基毒死蜱、三唑磷、毒死蜱、甲胺磷、西维因、呋喃丹、氰戊菊酯、灭多威等;杀菌剂有三唑酮、噻菌灵、克菌丹、异菌唑、硝苯唑、福美双等;除草剂有草甘膦、百草枯、2,4-D、阿特拉津、麦草畏、西玛津、吡草胺、扑草净、精喹禾灵、氯磺隆等;植物(昆虫)生长调节剂有抑芽丹、氟虫脲、甲氧保幼激素等。

[0003] 噻虫啉是德国拜耳农用化学品公司开发的新型氯代烟碱类杀虫剂,主要作用于昆虫神经接合后膜,通过与烟碱乙酰胆碱受体结合,干扰昆虫神经系统正常传导,引起神经通道的阻塞,造成乙酰胆碱的大量积累,从而使昆虫异常兴奋,全身痉挛、麻痹而死。该种农药作用特点是:具有较强的内吸、触杀和胃毒作用,既可用于茎叶处理,也可用于土壤、种子处理。能够防治水稻、蔬菜、果树、棉花和马铃薯等作物上的大多数害虫,对稻蓟马、稻飞虱等害虫有较好的防治效果。随着噻虫啉使用范围和用量的增大,其在水体、土壤乃至农产品中检出频率和检出浓度越来越高。发展环境中痕量噻虫啉的分析方法,是研究噻虫啉的环境行为和科学评估噻虫啉环境风险的前提。目前对噻虫啉的分析主要使用高效液相色谱法(HPLC),如韩振泰等采用 HPLC 法检测白蜡枝叶中噻虫啉的含量方法回收率达到 95.7~97.8%,检测限为 0.01mg mL⁻¹,该方法具有很强的代表性,可行性很强;胡敏等使用反向 HPLC 测定蔬果中的噻虫啉含量,该方法稳定,变异系数小于 0.201%,回收率高达 99.89%。但是,仪器检测方法还存在诸多不足,如测试成本高、分析时间长、前处理步骤繁琐及对操作人员要求较高等,不能满足环境水体、土壤、农产品等中噻虫啉残留的快速检测的需要。

发明内容

[0004] 针对现有技术中存在的问题,本发明提供了一种检测噻虫啉的 ELISA 试剂盒,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。

[0005] 本发明还要解决的技术问题是提供上述 ELISA 试剂盒的制备方法。

[0006] 本发明最后要解决的技术问题是提供上述 ELISA 试剂盒的应用。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案如下:

[0008] 一种检测噻虫啉的 ELISA 试剂盒,它包括:用噻虫啉包被抗原包被的酶标板、噻虫啉标准品、噻虫啉多克隆抗体工作液、噻虫啉酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液和浓缩洗涤液。

[0009] 其中,所述的噻虫啉包被抗原包被的酶标板按如下方法制备得到:将噻虫啉半抗原与卵清白蛋白(OVA)偶联得到噻虫啉包被抗原附着于酶标板中。

[0010] 其中,所述的噻虫啉半抗原的制备方法记载于中国专利 2015103352632 中,专利名称是一种噻虫啉半抗原的合成方法。具体方式是:在氮气保护下将噻虫啉、巯基丙酸(3-MPA)和氢氧化钾(KOH)混合,然后加入二甲亚砜(DMSO),搅拌至全部溶解;缓慢升温至 95 ~ 100℃,在 95 ~ 100℃保温反应 2 ~ 3h;将反应体系降温至 20 ~ 25℃,向该反应体系中加水,随后使用盐酸调节反应体系的 pH 值至 3 ~ 4;向反应体系中加三氯甲烷进行萃取,收集下层有机层;用盐酸调节有机层液体的 pH 值至 5 ~ 6,抽滤,滤液减压脱水得到的固体用甲醇打浆溶解,过滤,滤液减压脱水得到产物;产物过硅胶柱,旋蒸,得到噻虫啉半抗原纯品。

[0011] 其中,所述的噻虫啉标准品,其溶质噻虫啉的浓度为 4.096 μg/ml,溶剂为水。

[0012] 其中,所述的噻虫啉多克隆抗体工作液是采用噻虫啉人工抗原免疫兔制得噻虫啉多克隆抗体,再将噻虫啉多克隆抗体用稀释液按体积比稀释成 1:3200 的比例,所述的稀释液为含 5mg/ml BSA 的 PBS 溶液。

[0013] 其中,所述的噻虫啉酶标二抗工作液是将酶标二抗用稀释液按体积比稀释成 1:5000 的比例,所述的稀释液为含 5mg/ml BSA 的 PBS 溶液。

[0014] 其中,所述的底物液 A 为含有 0.5mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液(pH5.0 ~ 5.4);所述的底物液 B 为 2mg/ml 的四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述的终止液为 2mol/L 的硫酸水溶液;所述浓缩洗涤液是 10 倍浓缩洗涤液,所述浓缩洗涤液为 0.01mol/L、pH 7.0 ~ 7.5 的 PBST(注:100mLPBST 中含 0.5mL 吐温-20)。

[0015] 上述检测噻虫啉的 ELISA 试剂盒的制备方法,它包括如下步骤:

[0016] (1) 用噻虫啉包被抗原包被的酶标板的制备:

[0017] 将噻虫啉半抗原与卵清白蛋白偶联得到噻虫啉包被抗原,将噻虫啉包被抗原稀释成 0.25 μg/ml,100 μL/孔在酶标板上点样,4℃过夜;取出酶标板甩掉板内液体,用 10 倍稀释后的浓缩洗涤液 300 μL/孔洗板 3 次,30s/次;然后加入含 5mg/ml BSA 的 PBS 溶液封闭,380 μL/孔在上述酶标板上点样,37℃放置 2h,用 10 倍稀释后的浓缩洗涤液 300 μL/孔洗板 3 次,30s/次,拍干;将酶标板真空密封后置 4℃下保存;

[0018] 其中,将噻虫啉半抗原与卵清白蛋白偶联得到噻虫啉包被抗原,具体步骤为:取 0.2mmol 噻虫啉半抗原,溶于 3mL 无水 N,N-二甲基甲酰胺(DMF),加入 46mg N-羟基丁二酰亚胺(NHS)和 78mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)·HCL。室温避光搅拌反应过夜。取 44mg 卵清白蛋白(OVA)溶于 15mL 硼酸盐缓冲液(0.2mol/L,pH8.7)。然后在 1h 内将上述过夜活化的半抗原溶液加入 OVA 溶液中,使半抗原与 OVA 的摩尔比约为 30:1,室温搅拌反应 2h 后,于 4℃反应过夜。用蒸馏水透析 3d,每天换水 3 次,透析液冷冻干燥即得噻虫啉包被抗原(THC-OVA)。

[0019] (2) 噻虫啉标准品的制备:

[0020] 称取 0.0004g 噻虫啉标准品,用蒸馏水定容至 100mL,得到浓度为 4096ng/mL 的

母液,依次按二倍比稀释,分别得到浓度为 2048ng/mL、1024ng/mL、512ng/mL、256ng/mL、128ng/mL、64ng/mL、32ng/mL、16ng/mL、8ng/mL、4ng/mL、2ng/mL、1ng/mL 的标准品溶液,同时补充空白 0ng/mL 的标准品溶液。

[0021] (3) 噻虫啉多克隆抗体工作液的制备:

[0022] 采用噻虫啉人工抗原免疫兔制得噻虫啉多克隆抗体,将噻虫啉多克隆抗体用稀释液按体积比稀释成 1:3200 的比例即得,所述的稀释液为含 5mg/ml BSA 的 PBS 溶液;

[0023] 其中,采用噻虫啉人工抗原免疫兔制得噻虫啉多克隆抗体,具体步骤为:选用 3 月龄健康大白兔,通过三次免疫,第 1 周给家兔注射卡介苗 0.2mL/只(约 15mg),采耳血,备用。首次免疫用完全佐剂 0.5mL 加抗原 1mg,充分混匀,背部皮内多点注射。2 周后进行加强免疫,不完全佐剂 0.5mL 加抗原 0.5mg,充分混匀,背部皮内多点注射。4 周后进行二次加强免疫,不完全佐剂 0.5mL 加抗原 0.5mg,充分混匀,背部皮内多点注射,每次免疫间隔 4 周;首次免疫后第 5、7、11 周采耳血 1 次,血清鉴定,并于第 11 周静脉取血,分离血清;用饱和硫酸铵沉淀法纯化抗体,50%和 33%饱和硫酸铵依次沉淀 3 次。纯化后的抗体用 0.01mL/L PBS(pH7.4)4℃冰箱中透析,浓缩,分装小瓶,冷冻干燥,放 -20℃冰箱保存备用得到噻虫啉多克隆抗体。

[0024] (4) 噻虫啉酶标二抗工作液的制备:

[0025] 将酶标二抗用稀释液按体积比稀释成 1:5000 的比例,所述的稀释液为含 5mg/ml BSA 的 PBS 溶液。

[0026] (5) 底物液 A 和底物液 B 的制备:

[0027] 所述的底物液 A 为含有 0.5mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液(pH5.0~5.4);

[0028] 所述的底物液 B 为 2mg/ml 四甲基联苯二胺的乙醇溶液。

[0029] (6) 终止液的制备:

[0030] 2mol/L 的硫酸水溶液。

[0031] (7) 浓缩洗涤液的制备:

[0032] 0.01mol/L 的 PBST(注:100mLPBST 中含 0.5mL 吐温-20)。

[0033] 上述检测噻虫啉的 ELISA 试剂盒在检测噻虫啉中的应用也在本发明的保护范围之内。

[0034] 其中,所述的噻虫啉为存在于土壤中的噻虫啉,噻虫啉在土壤中的含量为 0.001 μg/ml ~ 4.096 μg/ml。

[0035] 其中,试剂盒的具体应用方法包括以下步骤:

[0036] (a) 预处理待测样品,将待测试的样品处理为液体样品,并将其复溶于稀释液中,所述的稀释液为含 5mg/ml BSA 的 PBS 溶液;

[0037] (b) 将试剂盒中的所有试剂从冷藏环境中取出,置于室温(20~25℃)条件下平衡 30min 以上,每种试剂使用前须摇匀;

[0038] (c) 取用噻虫啉包被抗原包被的酶标板,加入预处理后的待测样品或标准品和噻虫啉多克隆抗体工作液按体积比 1:1 的预混液,每孔 100 μL,37℃保温 2h,PBST 洗涤 3 次,拍干;

[0039] (d) 向步骤(c)得到的酶标板中加入噻虫啉酶标二抗工作液,每孔 100 μL,37℃保

温 1h, PBST 洗涤 3 次, 拍干;

[0040] (e) 向步骤 (d) 得到的酶标板中加入底物液 A 50 μ L/ 孔, 底物液 B 50 μ 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 5min;

[0041] (f) 向步骤 (e) 得到的酶标板中加入终止液 50 μ L/ 孔, 轻轻振荡混匀, 设定酶标仪于 450nm 处或双波长 450/630nm 检测, 测定每孔吸光度值, 在 5min 内读完数据;

[0042] (g) 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噻虫啉的含量。

[0043] 步骤 (a) 中, 将待测试的样品处理为液体样品, 具体按照如下步骤处理:

[0044] (I) 配制浸提液: 使用质量比为 2:1 的浓硫酸 (98%, 质量分数) 和浓硝酸 (69%, 质量分数) 混合液调节蒸馏水的 pH 值为 3.20 \pm 0.05;

[0045] (II) 将待测试样品研磨、破碎, 过 9.5mm 筛;

[0046] (III) 称取经过步骤 (II) 处理后的样品 50 ~ 100g 置于具盖容器中, 于 105 $^{\circ}$ C 下烘干, 恒重至两次称量值的误差小于 \pm 1%, 计算样品含水率;

[0047] (IV) 称取经过步骤 (III) 处理后的样品 150 ~ 200g, 置于 2L 具旋盖和内盖的广口瓶中, 根据样品的含水量, 按液固比为 10L:1kg 计算出所需浸提液的体积, 加入浸提液, 盖紧瓶盖后固定在翻转式振荡装置上, 调节转速为 30 \pm 2r/min, 于 23 \pm 2 $^{\circ}$ C 下振荡 18 \pm 2h, 振荡过程中定时打开提取瓶, 释放过度的压力;

[0048] (V) 在压力过滤器上装好 0.45 μ m 滤膜, 用稀硝酸 (10% g/mL) 淋洗过滤器和滤膜, 弃去淋洗液, 过滤并收集滤液;

[0049] (VI) 用 6mol/L 盐酸溶液调节步骤 (V) 得到的滤液 pH 值至 6.0 \pm 0.05, 待测。

[0050] 噻虫啉检测试剂盒的原理是固相间接竞争酶联免疫反应, 用包被抗原包被酶标板, 将待测样品、抗体工作液和酶标二抗工作液加入对应的孔检测, 在抗体有限的条件下, 固相抗原与待测抗原竞争结合抗体, 孵育一段时间后, 倒出孔里的液体, 清洗除去没有反应的物质后加入显色底物, 在酶的作用下孔里将会出现蓝色, 加入终止液, 底物颜色由蓝色变为黄色。显色颜色的深浅与结合物的量成正比例的关系, 与标准品或样品中噻虫啉的量成反比例关系。该方法可直接用于检测土壤中的噻虫啉。

[0051] 有益效果: 本发明的试剂盒检测方法操作简便, 检测灵敏 (灵敏度为 1.0ng/mL)、准确、快速, 适用于大批量样品的检测。

附图说明

[0052] 图 1 为噻虫啉标准曲线图。

具体实施方式

[0053] 根据下述实施例, 可以更好地理解本发明。然而, 本领域的技术人员容易理解, 实施例所描述的内容仅用于说明本发明, 而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

[0054] 实施例 1: 噻虫啉半抗原的合成

[0055] 一种噻虫啉半抗原的合成方法, 它包括如下步骤:

[0056] (1) 在氮气保护下向一个洁净干燥的 150ml 锥形瓶中分别加入 4mmol 噻虫啉

(1.000g), 4mmol 3-MPA(0.425g), 8mmol KOH(0.450g), 然后加入 20ml DMSO, 120 转 / 分钟缓慢搅拌至全部溶解;

[0057] (2) 120 转 / 分钟搅拌条件下, 2°C / 分钟缓慢升温至 100°C, 保持该温度反应 2 小时;

[0058] (3) 上述反应结束后, 体系温度降至 25°C, 向该反应体系 (20ml) 中加入 50ml 水, 随后使用 2mol/L 的盐酸溶液调节反应体系的 pH 值至 3;

[0059] (4) 向上述反应体系 (70ml) 中加入 30ml 三氯甲烷进行萃取, 共萃取三次, 收集下层有机层, 合并萃取液;

[0060] (5) 使用 2mol/L 的盐酸溶液调节萃取液的 pH 值至 5, 抽滤, 滤液减压 45°C 下脱干得到的固体用甲醇 (3 倍于固体体积) 打浆溶解, 过滤, 滤液减压 45°C 下脱干得到产物;

[0061] (6) 产物先用少量展开剂溶解后上硅胶柱, 洗脱剂为甲醇与乙酸乙酯按体积比 1:5 的混合物, 展开剂为甲醇与乙酸乙酯按体积比为 1:1 的混合物; 过柱后, 45°C 旋蒸, 得到纯品, 收率为 78.0%, 纯度为 86.5%。

[0062] 采用核磁共振氢谱 ($^1\text{H-NMR}$) 及电喷雾质谱对合成的半抗原结构进行验证。 $^1\text{H-NMR}$ 表征结果: $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-d₆); δ , 2.72 - 2.74 (t, 2H, CH₂COO), 3.37 - 3.41 (t, 2H, SCH₂), 3.53 - 3.57 (t, 2H, SCH₂), 4.00 - 4.04 (t, 2H, NCH₂), 4.66 (s, 2H, CH₂N), 7.27 - 7.29 (d, J08.0, 1H, CH), 7.61 - 7.63 (d, J08.4, 1H, CH), 8.45 (s, 1H, N = CH)。结果显示噻虫啉半抗原的合成是成功的。电喷雾质谱检测结果显示, 由母离子 (m/z) 253.0 及定性离子对 253.0>90.0, 253.0>99.2 可判断成功制备了噻虫啉半抗原。

[0063] 实施例 2: 试剂盒的制备:

[0064] 一种检测噻虫啉的 ELISA 试剂盒, 它包括如下物质:

[0065] 用噻虫啉包被抗原包被的酶标板: 96 孔酶标板 \times 1 块

[0066] 噻虫啉标准品 \times 14 瓶: (1mL/瓶) 0、1、2、4、8、16、32、64、128、256、512、1024、2048、4096ng/mL;

[0067]

噻虫啉多克隆抗体工作液	7 mL;
噻虫啉酶标二抗工作液	7 mL;
底物液 A	7 mL;
底物液 B	7 mL;
终止液	7 mL;
10 \times 浓缩洗涤液	20 mL。

[0068] 上述试剂的制备如下:

[0069] (1) 用噻虫啉包被抗原包被的酶标板的制备:

[0070] 将噻虫啉半抗原 (实施例 1 制备得到) 与卵清白蛋白偶联得到噻虫啉包被抗原, 将噻虫啉包被抗原稀释成 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{L}/$ 孔在酶标板上点样, 4, °C 过夜; 取出酶标板甩掉板内液体, 用 10 倍稀释后的浓缩洗涤液 300 $\mu\text{L}/$ 孔洗板 3 次, 30s/ 次; 然后加入含 5mg/

mL BSA 的 PBS 溶液封闭, 380 μ L/孔在上述酶标板上点样, 37 $^{\circ}$ C 放置 2h, 用 10 倍稀释后的浓缩洗涤液 300 μ L/孔洗板 3 次, 30s/次, 拍干; 将酶标板真空密封后置 4 $^{\circ}$ C 下保存;

[0071] 其中, 将噻虫啉半抗原与卵清白蛋白偶联得到噻虫啉包被抗原, 具体步骤为: 取 0.2mmol 噻虫啉半抗原, 溶于 3mL 无水 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF), 加入 46mg N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 和 78mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) \cdot HCL。室温避光搅拌反应过夜。取 44mg 卵清白蛋白 (OVA) 溶于 15mL 硼酸盐缓冲液 (0.2mol/L, pH8.7)。然后在 1h 内将上述过夜活化的半抗原溶液加入 OVA 溶液中, 使半抗原与 OVA 的摩尔比约为 30:1, 室温搅拌反应 2h 后, 于 4 $^{\circ}$ C 反应过夜。用蒸馏水透析 3d, 每天换水 3 次, 透析液冷冻干燥即得噻虫啉包被抗原 (THC-OVA)。同样的方法用 BSA 替换 OVA 可以制备噻虫啉免疫原 (THC-BSA)。

[0072] (2) 噻虫啉标准品的制备:

[0073] 称取 0.0004g 噻虫啉标准品, 用蒸馏水定容至 100mL, 得到浓度为 4096ng/mL 的母液, 使用试剂盒时依次按二倍比稀释, 分别得到浓度为 2048ng/mL、1024ng/mL、512ng/mL、256ng/mL、128ng/mL、64ng/mL、32ng/mL、16ng/mL、8ng/mL、4ng/mL、2ng/mL、1ng/mL 的标准品溶液。

[0074] (3) 噻虫啉多克隆抗体工作液的制备:

[0075] 采用噻虫啉人工抗原免疫兔制得噻虫啉多克隆抗体, 将噻虫啉多克隆抗体用稀释液按体积比稀释成 1:3200 的比例即得, 所述的稀释液为含 5mg/ml BSA 的 PBS 溶液;

[0076] 其中, 采用噻虫啉人工抗原免疫兔制得噻虫啉多克隆抗体, 具体步骤为: 选用 3 月龄健康大白兔, 通过三次免疫, 第 1 周给家兔注射卡介苗 0.2mL/只 (约 15mg), 采耳血, 备用。首次免疫用完全佐剂 0.5mL 加抗原 1mg, 充分混匀, 背部皮内多点注射。2 周后进行加强免疫, 不完全佐剂 0.5mL 加抗原 0.5mg, 充分混匀, 背部皮内多点注射。4 周后进行二次加强免疫, 不完全佐剂 0.5mL 加抗原 0.5mg, 充分混匀, 背部皮内多点注射, 每次免疫间隔 4 周; 首次免疫后第 5、7、11 周采耳血 1 次, 血清鉴定, 并于第 11 周静脉取血, 分离血清; 用饱和硫酸铵沉淀法纯化抗体, 50% 和 33% 饱和硫酸铵依次沉淀 3 次。纯化后的抗体用 0.01mL/L PBS (pH7.4) 4 $^{\circ}$ C 冰箱中透析, 浓缩, 分装小瓶, 冷冻干燥, 放 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用得到噻虫啉多克隆抗体。

[0077] (4) 噻虫啉酶标二抗工作液的制备:

[0078] 将酶标二抗用稀释液按体积比稀释成 1:5000 的比例, 所述的稀释液为含 5mg/ml BSA 的 PBS 溶液。

[0079] (5) 底物液 A 和底物液 B 的制备:

[0080] 所述的底物液 A 为含有 0.5mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液 (pH5.0 ~ 5.4);

[0081] 所述的底物液 B 为 2mg/ml 四甲基联苯二胺的乙醇溶液。

[0082] (6) 终止液的制备:

[0083] 2mol/L 的硫酸水溶液。

[0084] (7) 浓缩洗涤液 (10 倍浓缩洗涤液) 的制备:

[0085] 0.01mol/L 的 PBST (注: 100mL PBST 中含 0.5mL 吐温 -20), pH7.0-7.5。

[0086] 使用本试剂盒时的注意事项:

[0087] (1) 室温低于 20℃或试剂及样本没有回到室温 (20 ~ 25℃) 会导致所有标准的 OD 值偏低;

[0088] (2) 在洗板过程中如果出现板孔干燥的情况,则会出现标准曲线不成线性,重复性不好的现象。所以洗板拍干后应立即进行下一步操作;

[0089] (3) 每加一种试剂前需将其摇匀;

[0090] (4) 反应终止液为 2M 盐酸,避免接触皮肤;

[0091] (5) 不要使用过了有效日期的试剂盒;也不要使用过了有效期的试剂盒中的任何试剂,掺杂使用过了有效期的试剂盒会引起灵敏度的降低;不要交换使用不同批号试剂盒中的试剂;

[0092] (6) 储存条件:保存试剂盒于 2 ~ 8℃,不要冷冻,将不用的酶标板微孔板放进自封袋重新密封。标准物质和无色的发色剂对光敏感,因此要避免直接暴露在光线下;

[0093] (7) 试剂变质的迹象:发色试剂有任何颜色表明发色剂变质,应当弃之。0 标准的吸光度 (450/630nm) 值小于 0.5 (A450nm<0.5) 时,表示试剂可能变质,请勿使用;

[0094] (8) 该试剂盒最佳反应温度为 25℃,温度过高或过低将导致检测吸光度值和灵敏度发生变化。

[0095] 实施例 3:检测噻虫啉的 ELISA 试剂盒 (实施例 2 得到的) 检测土壤中噻虫啉的方法。

[0096] 具体检测方法包括如下步骤:

[0097] 一、样品处理:

[0098] (I) 配制浸提液:使用质量比为 2:1 的浓硫酸 (98%,质量分数) 和浓硝酸 (69%,质量分数) 混合液调节蒸馏水的 pH 值为 3.20 ± 0.05 ;

[0099] (II) 将待测试样品研磨、破碎,过 9.5mm 筛;

[0100] (III) 称取经过步骤 (II) 处理后的样品 50 ~ 100g 置于具盖容器中,于 105℃下烘干,恒重至两次称量值的误差小于 $\pm 1\%$,计算样品含水率;

[0101] (IV) 称取经过步骤 (III) 处理后的样品 150 ~ 200g,置于 2L 具旋盖和内盖的广口瓶中,根据样品的含水量,按液固比为 10L:1kg 计算出所需浸提液的体积,加入浸提液,盖紧瓶盖后固定在翻转式振荡装置上,调节转速为 $30 \pm 2r/min$,于 $23 \pm 2^\circ C$ 下振荡 $18 \pm 2h$,振荡过程中定时打开提取瓶,释放过度的压力;

[0102] (V) 在压力过滤器上装好 $0.45 \mu m$ 滤膜,用稀硝酸 (10%,质量分数) 淋洗过滤器和滤膜,弃去淋洗液,过滤并收集滤液;

[0103] (VI) 用 6mol/L 盐酸溶液调节步骤 (V) 得到的滤液 pH 值至 6.0 ± 0.05 ,得到预处理后的液体样品,待测。

[0104] 二试剂盒检测:

[0105] (a) 将预处理后的液体样品复溶于稀释液中,所述的稀释液为含 5mg/ml BSA 的 PBS 溶液;

[0106] (b) 将试剂盒中的所有试剂从冷藏环境中取出,置于室温 (20 ~ 25℃) 条件下平衡 30min 以上,每种试剂使用前须摇匀;

[0107] (c) 取用噻虫啉包被抗原包被的酶标板,加入预处理后的待测样品或标准品和噻虫啉多克隆抗体工作液按体积比 1:1 的预混液,每孔 100 μL ,37℃保温 2h,PBST 洗涤 3 次,

拍干；

[0108] (d) 向步骤 (c) 得到的酶标板中加入噻虫啉酶标二抗工作液, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1h, PBST 洗涤 3 次, 拍干；

[0109] (e) 向步骤 (d) 得到的酶标板中加入底物液 A 50 μL / 孔, 底物液 B 50 μL / 孔, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应 5min；

[0110] (f) 向步骤 (e) 得到的酶标板中加入终止液 50 μL / 孔, 轻轻振荡混匀, 设定酶标仪于 450nm 处或双波长 450/630nm 检测, 测定每孔吸光度值, 在 5min 内读完数据；

[0111] (g) 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噻虫啉的含量。

[0112] 三、分析结果

[0113] 用上述制备的试剂盒中的 14 个噻虫啉标准品浓度 0、1、2、4、8、16、32、64、128、256、512、1024、2048、4096ng/mL, 在 450/630nm 处测量吸光度值。

[0114] 百分吸光率的计算, 标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的百分吸光度值的平均值 (双孔) 除以第一个标准 (0 标准) 的吸光度值, 再乘以 100%, 即

[0115]

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

[0116] 其中 B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值, B_0 —0ppb 标准溶液的平均吸光度值。

[0117] 以标准品百分吸光率为纵坐标, 以噻虫啉标准品浓度 (ppb) 的半对数为横坐标绘制标准曲线, 求出直线方程。标准曲线见附图 1。 $y = -0.0489X + 0.4414, R^2 = 0.9168$ 。将样本的 B/ B_0 值代入标准曲线中, 从标准曲线上读出所对应样本的浓度, 乘以其对应的稀释倍数即为样本中噻虫啉的实际浓度。

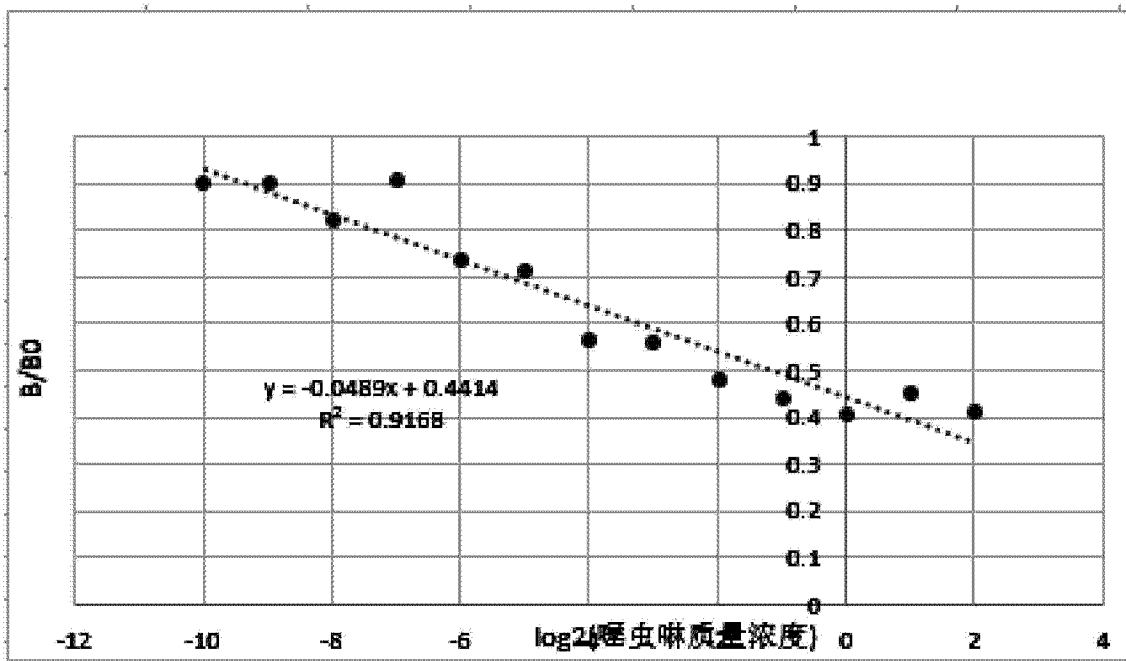


图 1

专利名称(译)	检测噻虫啉的ELISA试剂盒及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN104977403A	公开(公告)日	2015-10-14
申请号	CN201510394552.X	申请日	2015-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	环境保护部南京环境科学研究所		
申请(专利权)人(译)	环境保护部南京环境科学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	环境保护部南京环境科学研究所		
[标]发明人	程燕 焦少俊 姜锦林 卜元卿 周军英 单正军		
发明人	程燕 焦少俊 姜锦林 卜元卿 周军英 单正军		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N1/28		
CPC分类号	G01N33/543 G01N1/28 G01N1/286 G01N33/531 G01N2430/10		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测噻虫啉的ELISA试剂盒，它包括：用噻虫啉包被抗原包被的酶标板、噻虫啉标准品、噻虫啉多克隆抗体工作液、噻虫啉酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液和浓缩洗涤液。本发明还公开了上述试剂盒的制备方法与应用。本发明的试剂盒，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。

噻虫啉多克隆抗体工作液	7 mL;
噻虫啉酶标二抗工作液	7 mL;
底物液 A	7 mL;
底物液 B	7 mL;
终止液	7 mL;
10×浓缩洗涤液	20 mL。