



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106124752 A

(43)申请公布日 2016. 11. 16

(21)申请号 201610437747.2

(22)申请日 2016.06.17

(71)申请人 广州杰特伟生物科技有限公司

地址 510000 广东省广州市天河区中山大
道建中路5号海天楼1703室

(72)发明人 马永江

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种检测噻虫啉的ELLSA试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种检测噻虫啉的ELLSA试剂盒,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;噻虫啉多克隆抗体工作液是将噻虫啉多克隆抗体用稀释液按体积比稀释成1:2800-3200的比例,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1:3800-4200的比例,稀释液为4-6%脱脂乳;底物液A:柠檬酸9.33g,乙酰苯胺0.064g,Na₂HPO₄·12H₂O 36.85g,庆大霉素0.1g,30%H₂O₂ 155 μL,加灭菌水至1000mL;底物液B:TMB0.25g,丙酮4mL,乙醇46.5mL,氨基比林0.2g,柠檬酸2.1g,EDTA0.3g,庆大霉素0.1g,加灭菌水至1000mL。本发明操作简便,检测灵敏、准确、快速,适用于大批量样品的检测。

1. 一种检测噻虫啉的ELLSA试剂盒,其特征在于,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;

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1:2800-3200的比例,所述的稀释液为4-6%脱脂乳;

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1:3800-4200的比例,所述的稀释液为4-6%脱脂乳;

终止液为灭菌水89.1mL,逐滴加入10.9mL浓硫酸;

底物液A:柠檬酸9.33g,乙酰苯胺0.064g,Na₂HPO₄·12H₂O 36.85g,庆大霉素0.1g,30% H₂O₂ 155μL,加灭菌水至1000mL;

底物液B:TMB0.25g,丙酮4mL,乙醇46.5mL,氨基比林0.2g,柠檬酸2.1g,EDTA0.3g,庆大霉素0.1g,加灭菌水至1000mL。

2. 根据权利要求1所述的检测噻虫啉的ELLSA试剂盒,其特征在于,所述浓缩洗涤液为PBST洗涤液。

3. 根据权利要求1所述的检测噻虫啉的ELLSA试剂盒,其特征在于,将噻虫啉多克隆抗体用稀释液按体积比稀释成1:3000的比例。

4. 根据权利要求1所述的检测噻虫啉的ELLSA试剂盒,其特征在于,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1:4000的比例。

5. 根据权利要求1所述的检测噻虫啉的ELLSA试剂盒,其特征在于,所述的稀释液为5%脱脂乳。

6. 根据权利要求1所述的检测噻虫啉的ELLSA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。

7. 根据权利要求1所述的检测噻虫啉的ELLSA试剂盒,其特征在于,所述的噻虫啉包被抗原包被的酶标板是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。

一种检测噻虫啉的ELLSA试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及检测试剂盒技术领域,具体是一种检测噻虫啉的ELLSA试剂盒。

背景技术

[0002] 噻虫啉是一种新型氯代烟碱类杀虫剂,上世纪90年代由德国拜耳农化公司和日本拜耳农化公司合作开发。对刺吸式和咀嚼式口器害虫有特效。作用机理与其它传统杀虫剂有所不同,它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。具有较强的触杀、胃毒和内吸作用,速效且持效期长。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),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

[0003] 本发明的目的在于提供一种检测灵敏、准确、快速的检测噻虫啉的ELLSA试剂盒,以解决上述背景技术中提出的问题。

[0004] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

一种检测噻虫啉的ELLSA试剂盒,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;

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1:2800-3200的比例,所述的稀释液为4-6%脱脂乳;

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1:3800-4200的比例,所述的稀释液为4-6%脱脂乳;

终止液为灭菌水89.1mL,逐滴加入10.9mL浓硫酸;

底物液A:柠檬酸9.33g,乙酰苯胺0.064g,Na₂HPO₄·12H₂O 36.85g,庆大霉素0.1g,30% H₂O₂ 155μL,加灭菌水至1000mL;

底物液B:TMB0.25g,丙酮4mL,乙醇46.5mL,氨基比林0.2g,柠檬酸2.1g,EDTA0.3g,庆大霉素0.1g,加灭菌水至1000mL。

[0005] 作为本发明进一步的方案:所述浓缩洗涤液为PBST洗涤液。

[0006] 作为本发明进一步的方案:将噻虫啉多克隆抗体用稀释液按体积比稀释成1:3000的比例。

[0007] 作为本发明进一步的方案: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1:4000的比例。

[0008] 作为本发明进一步的方案:所述的稀释液为5%脱脂乳。

[0009] 作为本发明进一步的方案:所述的噻虫啉标准品,其溶质噻虫啉的浓度分别为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。

[0010] 作为本发明进一步的方案:所述的噻虫啉包被抗原包被的酶标板是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。

[0011] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

本发明的试剂盒检测方法操作简便,检测灵敏、准确、快速,适用于大批量样品的检测。

具体实施方式

[0012] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0013] 实施例1

本发明实施例中,一种检测噻虫啉的ELLSA试剂盒,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。噻虫啉包被抗原包被的酶标板是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。所述的噻虫啉标准品,其溶质噻虫啉的浓度分别为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。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1:2800的比例,所述的稀释液为4%脱脂乳。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1:3800的比例,所述的稀释液为4%脱脂乳。所述终止液为灭菌水89.1mL,逐滴加入10.9mL浓硫酸。底物液A:柠檬酸9.33g,乙酰苯胺0.064g,Na₂HP0₄·12H₂O 36.85g,庆大霉素0.1g,30%H₂O₂ 155μL,加灭菌水至1000mL。底物液B:TMB0.25g,丙酮4mL,乙醇46.5mL,氨基比林0.2g,柠檬酸2.1g,EDTA0.3g,庆大霉素0.1g,加灭菌水至1000mL。所述浓缩洗涤液为PBST洗涤液。

[0014] 实施例2

本发明实施例中,一种检测噻虫啉的ELLSA试剂盒,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。噻虫啉包被抗原包被的酶标板是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。所述的噻虫啉标准品,其溶质噻虫啉的浓度分别为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。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6%脱脂乳。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1:4200的比例,所述的稀释液为6%脱脂乳。所述终止液为灭菌水89.1mL,逐滴加入

10.9mL浓硫酸。底物液A:柠檬酸9.33g,乙酰苯胺0.064g,Na₂HPO₄·12H₂O 36.85g,庆大霉素0.1g,30%H₂O₂ 155μL,加灭菌水至1000mL。底物液B:TMB0.25g,丙酮4mL,乙醇46.5mL,氨基比林0.2g,柠檬酸2.1g,EDTA0.3g,庆大霉素0.1g,加灭菌水至1000mL。所述浓缩洗涤液为PBST洗涤液。

[0015] 实施例3

本发明实施例中,一种检测噻虫啉的ELLSA试剂盒,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。噻虫啉包被抗原包被的酶标板是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。所述的噻虫啉标准品,其溶质噻虫啉的浓度分别为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。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1:3000的比例,所述的稀释液为5%脱脂乳。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1:4000的比例,所述的稀释液为5%脱脂乳。所述终止液为灭菌水89.1mL,逐滴加入10.9mL浓硫酸。底物液A:柠檬酸9.33g,乙酰苯胺0.064g,Na₂HPO₄·12H₂O 36.85g,庆大霉素0.1g,30%H₂O₂ 155μL,加灭菌水至1000mL。底物液B:TMB0.25g,丙酮4mL,乙醇46.5mL,氨基比林0.2g,柠檬酸2.1g,EDTA0.3g,庆大霉素0.1g,加灭菌水至1000mL。所述浓缩洗涤液为PBST洗涤液。

[0016] 按照常规方法制得检测噻虫啉的ELLSA试剂盒,并将实施例3的ELLSA试剂盒用于检测土壤中噻虫啉的情况。具体步骤如下所述。

[0017] 一、样品处理:

1. 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;

2. 将待测试样品研磨、破碎,过5mm筛;

3. 称取经过步骤2处理后的样品50-100g摊置于具盖容器中,于105℃下烘干,恒重至两次称量值的误差小于±1%,计算样品含水率;

4. 称取经过步骤3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±12r/min,于23±2℃下振荡18±2h,振荡过程中定时打开提取瓶,释放过度的压力;

5. 在压力过滤器上装好0.45μm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;

6. 用6mol/L盐酸溶液调节步骤5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。

[0018] 二、将处理的液体样品用实施例3的ELLSA试剂盒检测,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。

[0019] 三、分析结果

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、1024ng/mL,在450/630nm处测量吸光度值。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

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

其中B-标准溶液或样本溶液的平均吸光度值,B₀-0ppb标准溶液的平均吸光度值。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。标准曲线为: $y = -0.0486X + 0.4414$, $R^2 = 0.9205$ 。将样本的B/B₀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为18.63ng/mL。

[0020] 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。

[0021] 此外,应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施例中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

专利名称(译)	一种检测噻虫啉的ELLSA试剂盒		
公开(公告)号	CN106124752A	公开(公告)日	2016-11-16
申请号	CN201610437747.2	申请日	2016-06-17
[标]申请(专利权)人(译)	广州杰特伟生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州杰特伟生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州杰特伟生物科技有限公司		
[标]发明人	马永江		
发明人	马永江		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/54306		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测噻虫啉的ELLSA试剂盒，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；噻虫啉多克隆抗体工作液是将噻虫啉多克隆抗体用稀释液按体积比稀释成1:2800-3200的比例，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1:3800-4200的比例，稀释液为4-6%脱脂乳；底物液A：柠檬酸9.33g，乙酰苯胺0.064g，Na₂HPO₄·12H₂O 36.85g，庆大霉素0.1g，30%H₂O₂ 155μL，加灭菌水至1000mL；底物液B：TMB0.25g，丙酮4mL，乙醇46.5mL，氨基比林0.2g，柠檬酸2.1g，EDTA0.3g，庆大霉素0.1g，加灭菌水至1000mL。本发明操作简便，检测灵敏、准确、快速，适用于大批量样品的检测。