



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110646603 A

(43)申请公布日 2020.01.03

(21)申请号 201910938841.X

(22)申请日 2019.09.30

(71)申请人 云南省烟草农业科学研究院  
地址 650021 云南省昆明市圆通街33号

(72)发明人 逢涛 李勇 师君丽 邓小鹏  
李永平 罗贵昆 孔光辉

(74)专利代理机构 昆明知道专利事务所(特殊  
普通合伙企业) 53116

代理人 姜开侠 姜开远

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/537(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

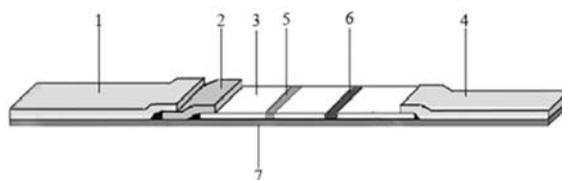
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种烯酰吗啉胶体金试剂盒及其应用

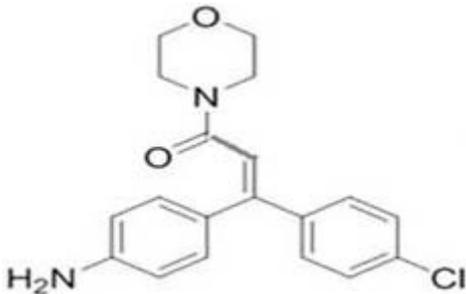
(57)摘要

本发明公开了一种烯酰吗啉胶体金检测试剂盒及其应用。所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒包括试剂盒盒体、检测试纸条、样品提取液、样品复溶液；其中，所述检测试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫、PVC底板；所述结合物释放垫上包被有烯酰吗啉特异性抗体-胶体金标记物；所述反应膜上包被有烯酰吗啉半抗原-OVA偶联物构成的检测线和包被抗体构成的质控线。本发明烯酰吗啉胶体金检测试剂盒，能够实现对烟草中烯酰吗啉的半定量检测，具有检测快速，准确，便捷的优点，且能够同时检测大批量样本，能满足市场对烟草中烯酰吗啉残留的快速检测需求。



1. 一种烯酰吗啉胶体金检测试剂盒,其特征就在于所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒包括试剂盒盒体、检测试纸条、样品提取液和样品复溶液,所述的检测试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫、PVC底板;所述的结合物释放垫上包被有烯酰吗啉特异性抗体-胶体金标记物;所述的反应膜上包被有烯酰吗啉半抗原-OVA偶联物构成的检测线和包被抗抗体构成的质控线。

2. 根据权利要求1所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒,其特征就在于所述的烯酰吗啉半抗原-OVA偶联物由烯酰吗啉半抗原与OVA偶联得到,烯酰吗啉半抗原结构式如下:



具体制备过程如下:

(a) 在250ml三口瓶中加入对硝基苯甲酰氯8.0~10.0g,氯苯90~110ml,冰盐浴控温0~5℃加入无水三氯化铝10~15g后,室温反应10~15h,反应完毕,将反应液倒入250ml加冰的2M盐酸水溶液,分液,有机相脱溶柱层析,流动相为体积配比为1:3的乙酸乙酯-石油醚,得到白色固体4-氯-4'-硝基二苯甲酮;

(b) 在250ml三口瓶中加入磷酰基乙酸三乙酯6.2g,四氢呋喃150ml,冰盐浴控温0~5℃加入叔丁醇钠2.7g后,室温反应0.4~0.6h,加入步骤(a)产物4-氯-4'-硝基二苯甲酮6.0g,室温反应10~15h,反应液用4M氯化铵水溶液50ml×3洗涤,有机相脱溶柱层析,流动相为体积配比为1:3的乙酸乙酯-石油醚,得到白色固体;

(c) 在250ml三口瓶中加入步骤(b)产物4.7g,无水乙醇150ml,室温下加入氢氧化钠6.0g,室温搅拌反应3~5h后,脱溶,加去离子水100ml,用6M盐酸调pH值至4,用乙酸乙酯100ml×2萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,脱溶得到白色固体产物;

(d) 在250ml单口瓶中加入步骤(c)产物3.0g,HOBt1.5g,乙酸乙酯100ml,室温搅拌反应0.5~1.5h,加入吗啉1.0g,EDCI2.0g,室温搅拌反应12h后,用水50ml×3洗涤,有机相脱溶后产物用于下一步反应;

(e) 将步骤(d)产物加入250ml单口瓶中,加入二水合氯化亚锡10.0g,乙酸乙酯100ml,加热回流反应6h,待反应液冷却后,用饱和碳酸钾水溶液50ml×3洗涤,有机相脱溶柱层析纯化,流动相为体积配比为7:3的乙酸乙酯-石油醚,得到淡黄色固体即为烯酰吗啉氨基类似物,即本发明烯酰吗啉半抗原,进一步烘干,于4℃保存。

3. 根据权利要求1所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒,其特征就在于所述烯酰吗啉特异性抗体为单克隆抗体,由烯酰吗啉半抗原-BSA偶联物免疫Balb/c小鼠得到。

4. 根据权利要求3所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒,其特征就在于所述的烯酰吗啉半抗原-BSA偶联物的制备过程如下:

(a) 用0.1 M盐酸溶液配制4 mM浓度的烯酰吗啉半抗原,4℃搅拌,滴加1% NaNO<sub>2</sub>至过量,NaNO<sub>2</sub>用淀粉-碘化钾纸条监控,至溶液变蓝黑,继续反应15 min,所述百分含量为质量百分

含量；

(b) 用pH为8.2, 0.1 M碳酸盐缓冲液溶解BSA, BSA蛋白浓度为18.9 mg/mL；

(c) 将步骤(a) 烯酰吗啉半抗原加入到步骤(b)的BSA中, 调节pH至9.5, 继续4℃搅拌2 h后, 调节pH至9.0, 用0.1mol/LPB透析两天, 除去未反应的小分子物质, 得到烯酰吗啉半抗原-BSA偶联物。

5. 根据权利要求1所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒, 其特征在于所述的样品提取液为 20%N,N-二甲基甲酰胺水溶液, 所述百分含量为体积百分含量。

6. 根据权利要求1所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒, 其特征在于所述的样品复溶液为pH6.0, 0.05mol/LMES缓冲液。

7. 根据权利要求1所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒, 其特征在于所述的胶体金粒径为30 nm。

8. 根据权利要求1所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒, 其特征在于所述的质控线上包被的抗体为羊抗鼠抗抗体。

9. 根据权利要求1所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒, 其特征在于所述的检测试纸条还设置有塑料外盒, 塑料外盒上对应样品吸收垫的上方设置有加样孔, 塑料外盒上对应检测线和质控线上方设置有观察窗口。

10. 一种权利要求1~9任一所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒的应用, 其特征在于所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒在检测烟草中烯酰吗啉残留量中的应用。

## 一种烯酰吗啉胶体金试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域,具体涉及一种烯酰吗啉胶体金试剂盒及其应用。

### 背景技术

[0002] 烯酰吗啉(dimethomorph)是德国巴斯夫公司研发的吗啉类杀菌剂,在世界各地均有广泛应用,其由美国氰胺公司在我国登记并推广应用,商品名称“安克”、“安克锰锌”。烯酰吗啉是广谱性杀菌剂,其主要是通过引起孢子囊壁的分解,从而使菌体死亡。烯酰吗啉对霜霉病、霜疫霉病、晚疫病、疫霉病、疫腐病、腐霉病、黑胫病等低等真菌性病害均具有很好的防治效果。烯酰吗啉的内吸性极强,根部施药,可通过根部进入植株的各个部位,叶面喷洒,亦可进入叶片内部,及时防治已侵入作物体内的病菌。

[0003] 目前在我国以烯酰吗啉为主要成分的农药制剂登记使用的作物主要为蔬菜与水果,用于防治霜霉病和疫病,烟草中主要防治黑胫病。烯酰吗啉虽属于低毒农药,但其不足之处是降解缓慢,容易在农作物中形成残留,对人体健康造成严重威胁。因此,烯酰吗啉农药残留水平也受到了广泛关注。目前,部分国家和区域食品安全规范对烯酰吗啉在部分农作物的最大残留限量做了规定。

[0004] 对于烯酰吗啉的检测,现有技术有理化方法和生物学方法。其中,理化方法主要有气相色谱、液相色谱、液质联用、气质联用等,理化检测方法存在检测成本高,对设备和检测人员的专业性要求极其严格,检测结果易受到样品中杂质干扰影响,需要复杂的样品前处理过程,所需检测时间长,不能实现快速检测等缺点。生物学方法中酶联免疫法技术也已经公开,公开号为CN108205060A专利文献公开了一种“检测烯酰吗啉的酶联免疫试剂盒及其应用”,该方法用酶联免疫试剂盒检测蔬菜中烯酰吗啉,该检测同样不能达到快速检测,而且成本也相对较高。目前对烟草中烯酰吗啉残留的生物学检测方法未见相关报道。

### 发明内容

[0005] 本发明的第一目的在于提供一种烯酰吗啉胶体金试剂盒;第二目的在于提供所述的烯酰吗啉胶体金试剂盒的应用。

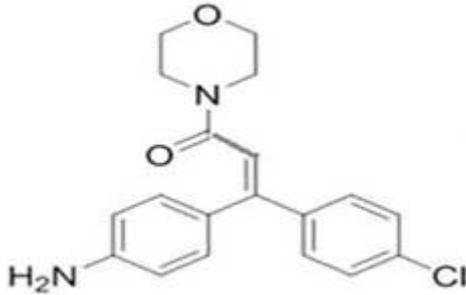
[0006] 本发明的第一目的是这样实现的,所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒包括试剂盒盒体、检测试纸条、样品提取液和样品复溶液。

[0007] 其中,所述检测试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫、PVC底板;

其中,所述结合物释放垫上包被有烯酰吗啉特异性抗体-胶体金标记物;

其中,所述反应膜上包被有烯酰吗啉半抗原-OVA偶联物构成的检测线和包被抗体构成的质控线。

[0008] 作为优选,所述烯酰吗啉半抗原-OVA偶联物由烯酰吗啉半抗原与OVA偶联得到,烯酰吗啉半抗原结构式如下,



其具体制备过程如下：

(a) 在250 mL三口瓶中加入对硝基苯甲酰氯9.0 g,氯苯100 mL,冰盐浴控温0-5℃加入无水三氯化铝13 g后,室温反应12 h,反应完毕,将反应液倒入250 mL加冰的2 M盐酸水溶液,分液,有机相脱溶柱层析,流动相为乙酸乙酯:石油醚=1:3,得白色固体4-氯-4'-硝基二苯甲酮;

(b) 在250 mL三口瓶中加入膦酰基乙酸三乙酯6.2 g,四氢呋喃150 mL,冰盐浴控温0-5℃加入叔丁醇钠2.7 g后,室温反应0.5 h,加入步骤(a)产物4-氯-4'-硝基二苯甲酮6.0 g,室温反应12 h,反应液用4 M氯化铵水溶液50 mL×3洗涤,有机相脱溶柱层析,流动相为乙酸乙酯:石油醚=1:3,得白色固体;

(c) 在250 mL三口瓶中加入步骤(b)产物4.7 g,无水乙醇150 mL,室温下加入氢氧化钠6.0 g,室温搅拌反应4 h后,脱溶,加去离子水100 mL,用6 M盐酸调pH至4,用乙酸乙酯100 mL×2萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,脱溶得白色固体产物;

(d) 在250 mL单口瓶中加入步骤(c)产物3.0 g,HOBt1.5 g,乙酸乙酯100 mL,室温搅拌反应1 h,加入吗啉1.0 g,EDCI 2.0 g,室温搅拌反应12 h后,用水50 mL×3洗涤,有机相脱溶后产物用于下一步反应;

(e) 将步骤(d)产物加入250 mL单口瓶中,加入二水合氯化亚锡10.0 g,乙酸乙酯100 mL,加热回流反应6 h,待反应液冷却后,用饱和碳酸钾水溶液50 mL×3洗涤,有机相脱溶柱层析纯化,流动相为乙酸乙酯:石油醚=7:3,得淡黄色固体即为烯酰吗啉氨基类似物,即本发明烯酰吗啉半抗原,进一步烘干,于4℃保存。

[0009] 作为优选,所述烯酰吗啉特异性抗体为单克隆抗体,其由烯酰吗啉半抗原-BSA偶联物免疫Balb/c小鼠得到。

[0010] 作为优选,所述烯酰吗啉-BSA偶联物的制备过程如下:

(a) 用0.1 M盐酸溶液配制4 mM浓度的烯酰吗啉半抗原,4℃搅拌,滴加1% NaNO<sub>2</sub>至过量,NaNO<sub>2</sub>用淀粉-碘化钾纸条监控,至溶液变蓝黑,继续反应15 min;

(b) 用pH为8.2,0.1 M碳酸盐缓冲液溶解BSA,BSA蛋白浓度为18.9 mg/mL;

(c) 将步骤(a)烯酰吗啉半抗原加入到步骤(b)的BSA中,调节pH至9.5,继续4℃搅拌2 h后,调节pH至9.0,用0.1mol/LPB透析两天,除去未反应的小分子物质,得到烯酰吗啉半抗原-BSA偶联物。

[0011] 作为优选,所述样品提取液为20%N,N-二甲基甲酰胺水溶液,所述百分含量为体积百分含量。

[0012] 作为优选,所述样品复溶液为 pH6.0,0.05mol/LMES缓冲液。

[0013] 作为优选,所述胶体金为粒径30 nm胶体金,30 nm胶体金对于烯酰吗啉特异性抗体的结合性能更为理想,对于样品中烯酰吗啉的吸收更为有效。

[0014] 作为优选,所述质控线上包被的抗抗体为羊抗鼠抗抗体。

[0015] 作为优选,所述检测试纸条还可以设塑料外盒,塑料外盒上对应样品吸收垫的上方设置有加样孔,塑料外盒上对应检测线和质控线上方设置有观察窗口,用于保护检测试纸条,降低外界干扰,同时便于检测试纸条取放。

[0016] 本发明的第二目的是这样实现的,所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒在检测烟草中烯酰吗啉残留量中的应用。

[0017] 免疫层析胶体金技术作为一种免疫学方法,是目前较为理想的快速检测方法,具有检测简单、快速、准确、污染小、能同时检测大批量样本等特点。

[0018] 本发明所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒采用了竞争抑制免疫层析的原理,样品中的烯酰吗啉在流动的过程中与胶体金标记的烯酰吗啉特异性抗体结合,抑制抗体和反应膜检测线上的烯酰吗啉半抗原-OVA偶联物结合,从而导致检测线颜色深浅的变化,来快速判断样本中烯酰吗啉残留情况。本发明烯酰吗啉胶体金检测试剂盒具有检测快速、准确、便捷、成本低的优点,非常适合大批量烟草样本中烯酰吗啉残留的快速检测,是一种十分理想的快速检测产品。

## 附图说明

[0019] 图1为本发明烯酰吗啉胶体金检测试剂盒中检测试纸条结构示意图。

## 具体实施方式

[0020] 下面结合实施例和附图对本发明作进一步的说明,但不以任何方式对本发明加以限制,基于本发明教导所作的任何变换或替换,均属于本发明的保护范围。

[0021] 本发明所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒包括试剂盒盒体、检测试纸条、样品提取液和样品复溶液,所述的检测试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫、PVC底板;所述的结合物释放垫上包被有烯酰吗啉特异性抗体-胶体金标记物;所述的反应膜上包被有烯酰吗啉半抗原-OVA偶联物构成的检测线和包被抗抗体构成的质控线。

[0022] 其中,所述检测试纸条,如图1所示,包括样品吸收垫1、结合物释放垫2、反应膜3、吸水垫4、PVC底板7;样品吸收垫1为无纺布或滤血膜,吸水垫4为吸水纸,结合物释放垫2为玻璃纤维,结合物释放垫2位于样品吸收垫前端下面的1/4处,反应膜3为醋酸纤维素膜,反应膜上有检测线T线5和质控线C线6,其中,反应膜检测线5包被有烯酰吗啉半抗原-OVA偶联物,反应膜质控线6包被有羊抗鼠抗抗体;其中,结合物释放垫2包被有烯酰吗啉单克隆抗体-胶体金标记物。进一步地,检测试纸条还可以设塑料外盒,塑料外盒上对应样品吸收垫1的上方设置有加样孔,塑料外盒上对应检测线5和质控线6上方设置有观察窗口。

[0023] 其中,检测线5处包被物烯酰吗啉半抗原-OVA偶联物用0.1 mol/L磷酸盐溶液稀释至0.5 mg/mL,质控线6处包被物羊抗鼠抗抗体用0.1 mol/L磷酸盐溶液稀释至0.5 mg/mL,烯酰吗啉半抗原-OVA偶联物和羊抗鼠抗抗体包被量均为1.0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,包被后37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干1.5 h。

[0024] 样品吸收垫1在组装之前用含有1.0% 牛血清白蛋白的pH7.2的磷酸盐溶液中浸泡1 h,37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干2 h。所述百分含量为体积百分含量。

[0025] 结合物释放垫在组装之前处理:将包被前的结合物释放垫先在如下溶液中浸泡

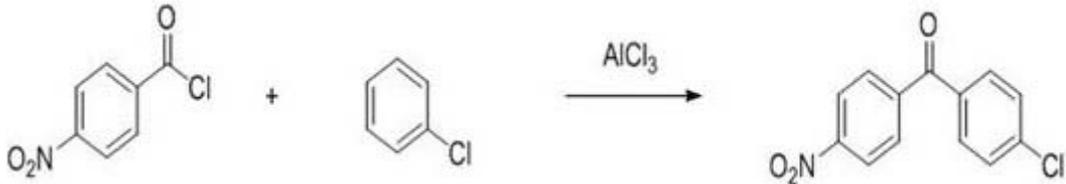
20-40 s,干燥,再进行所述烯酰吗啉单克隆抗体-胶体金标记物的包被:含有1.2%牛血清白蛋白、pH值为7.5、0.1mol/L磷酸盐缓冲液。所述百分含量为体积百分含量。

[0026] 其中主要部件的制备方法如下:

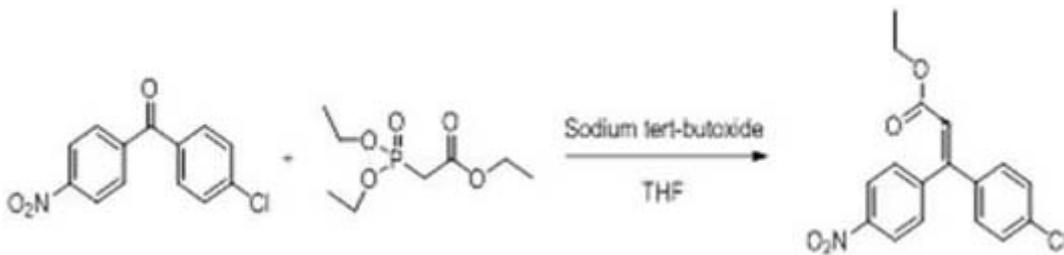
一、制备烯酰吗啉半抗原、烯酰吗啉半抗原-BSA及烯酰吗啉半抗原-OVA偶联物

1、烯酰吗啉半抗原制备方法如下:

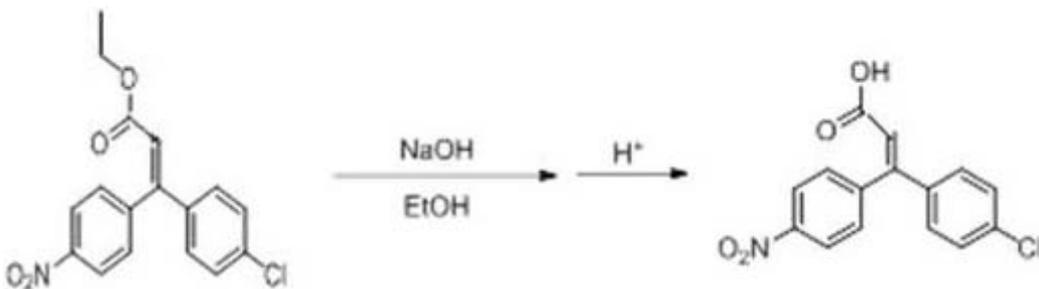
(a) 在250 mL三口瓶中加入对硝基苯甲酰氯9.0 g,氯苯100 mL,冰盐浴控温0-5℃加入无水三氯化铝13 g后,室温反应12 h,反应完毕,将反应液倒入250 mL加冰的2M盐酸水溶液,分液,有机相脱溶柱层析,流动相为乙酸乙酯:石油醚=1:3,得白色固体4-氯-4'-硝基二苯甲酮,合成线路如下:



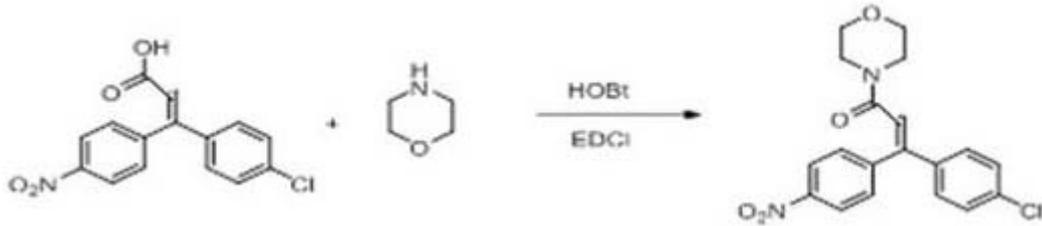
(b) 在250 mL三口瓶中加入膦酰基乙酸三乙酯6.2 g,四氢呋喃150 mL,冰盐浴控温0-5℃加入叔丁醇钠2.7 g后,室温反应0.5 h,加入步骤(a)产物4-氯-4'-硝基二苯甲酮6.0 g,室温反应12 h,反应液用4 M氯化铵水溶液50 mL×3洗涤,有机相脱溶柱层析,流动相为乙酸乙酯:石油醚=1:3,得白色固体,合成线路如下:



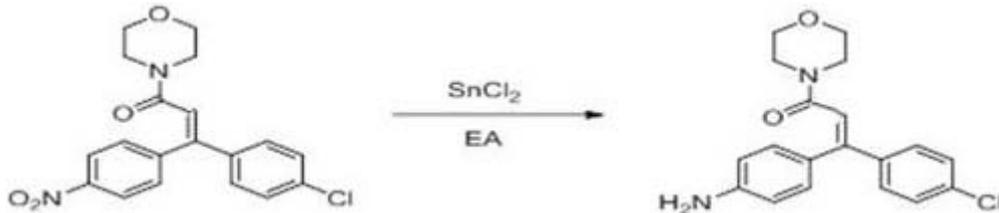
(c) 在250 mL三口瓶中加入步骤(b)产物4.7 g,无水乙醇150 mL,室温下加入氢氧化钠6.0 g,室温搅拌反应4 h后,脱溶,加水100 mL,用6 M盐酸调pH至4,用乙酸乙酯100 mL×2萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,脱溶得白色固体产物,合成线路如下:



(d) 在250 mL单口瓶中加入步骤(c)产物3.0 g,HOBt 1.5 g,乙酸乙酯100 mL,室温搅拌反应1 h,加入吗啉1.0 g,EDCI 2.0 g,室温搅拌反应12 h后,用水50 mL×3洗涤,有机相脱溶后产物用于下一步反应,合成路线如下:



(e) 将步骤(d)产物加入250 mL单口瓶中,加入二水合氯化亚锡10.0 g,乙酸乙酯100 mL,加热回流反应6 h,待反应液冷却后,用饱和碳酸钾水溶液50 mL×3洗涤,有机相脱溶柱层析纯化,流动相为乙酸乙酯:石油醚=7:3,得淡黄色固体即为烯酰吗啉氨基类似物,即本发明烯酰吗啉半抗原,进一步烘干,于4℃保存,合成线路如下:



## 2、烯酰吗啉半抗原-BSA偶联物制备(免疫抗原)

(a) 用0.1 M盐酸溶液配制4 mM浓度的烯酰吗啉半抗原,4℃搅拌,滴加1% NaNO<sub>2</sub>至过量,NaNO<sub>2</sub>用淀粉-碘化钾纸条监控,至溶液变蓝黑,继续反应15 min,百分含量为质量百分含量。

[0027] (b) 用pH为8.2,0.1 M碳酸盐缓冲液溶解BSA,BSA蛋白浓度为18.9 mg/mL;

(c) 将步骤(a)烯酰吗啉半抗原加入到步骤(b)的BSA中,调节pH至9.5,继续4℃搅拌2 h后,调节pH至9.0,用0.1mol/L PB透析两天,除去未反应的小分子物质,得到烯酰吗啉半抗原-BSA偶联物。

## [0028] 3、烯酰吗啉半抗原-OVA偶联物制备(包被抗原)

烯酰吗啉半抗原-OVA偶联物制备(包被抗原):包被抗原的合成步骤同烯酰吗啉半抗原-BSA偶联物合成步骤,不同之处在于载体蛋白为OVA。

## [0029] 二、制备烯酰吗啉单克隆抗体

### 1、动物免疫

挑选6-8周龄的Balb/c小鼠,用含有佛氏完全佐剂的烯酰吗啉半抗原-BSA偶联物进行皮下注射,免疫剂量为80 μg /只,第2,4和6周加强免疫,最后一次免疫在第8周,使其产生抗血清。

### [0030] 2、细胞融合和单克隆化

按5:1取小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞在PEG6000作用下进行融合,采用间接竞争ELISA测定以筛选阳性孔。采用有限稀释法对阳性孔进行单克隆化,直到得到分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。该单克隆抗体对烟草中烯酰吗啉的检测限能达到2 μg/g。

### [0031] 3、细胞冻存和复苏

将烯酰吗啉的单克隆杂交瘤细胞株冻存为成 $2 \times 10^6$ 个/mL的细胞悬液,在液氮中保存。复苏时取出冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

### [0032] 4、增量培养

将杂交瘤细胞置于RPMI-1640常规细胞培养基中,在37℃条件下进行培养,用辛酸-饱

和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体,于-20℃保存。

[0033] 三、羊抗鼠抗体制备:是以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病菌体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体。

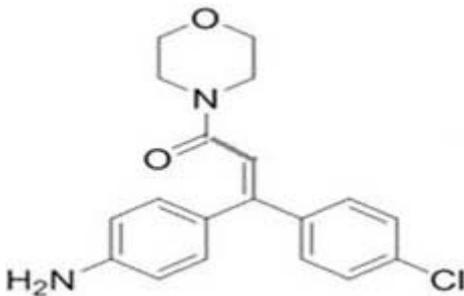
[0034] 四、胶体金制备及烯酰吗啉单克隆抗体-胶体金标记物的制备

1、胶体金标记物为粒径30 nm胶体金,其制备方法为:双蒸去离子水将1%氯金酸稀释成0.01%,取100 mL置于锥形瓶中,用恒温电磁搅拌器加热至沸腾,在持续高温、持续搅拌下加入0.75 mL 1%柠檬酸三钠,继续匀速搅拌加热至溶液呈透亮的红色时停止,冷却至室温后用去离子水恢复到原体积。所述百分含量为质量百分含量。

[0035] 2、烯酰吗啉单克隆抗体-胶体金标记物的制备

在磁力搅拌下,用0.1 mol/L碳酸钾溶液调胶体金的pH值至7.0,按每毫升胶体金溶液中加入100~300 μg抗体的标准向胶体金溶液中加入烯酰吗啉单克隆抗体,继续搅拌混匀,静置10 min,加入BSA、海藻糖搅拌混匀,使其在胶体金溶液中的终浓度分别为0.5g/100mL、1g/100mL。静置30 min,12000 rpm、4℃离心30 min,弃上清液,沉淀用含有0.5~1% 牛血清白蛋白,0.05~0.1%吐温-20,pH 7.4的0.1 mol/L的磷酸盐溶液洗涤两次,用体积为初始胶体金体积1/10的磷酸盐溶液将沉淀重悬得到胶体金单克隆抗体-胶体金标记物。百分含量为体积百分含量。

[0036] 所述的烯酰吗啉半抗原-OVA偶联物由烯酰吗啉半抗原与OVA偶联得到,烯酰吗啉半抗原结构式如下:



具体制备过程如下:

(a) 在250ml三口瓶中加入对硝基苯甲酰氯8.0~10.0g,氯苯90~110ml,冰盐浴控温0~5℃加入无水三氯化铝10~15g后,室温反应10~15h,反应完毕,将反应液倒入250ml加冰的2M盐酸水溶液,分液,有机相脱溶柱层析,流动相为体积配比为1:3的乙酸乙酯-石油醚,得到白色固体4-氯-4'-硝基二苯甲酮;

(b) 在250ml三口瓶中加入磷酰基乙酸三乙酯6.2g,四氢呋喃150ml,冰盐浴控温0~5℃加入叔丁醇钠2.7g后,室温反应0.4~0.6h,加入步骤(a)产物4-氯-4'-硝基二苯甲酮6.0g,室温反应10~15h,反应液用4M氯化铵水溶液50ml×3洗涤,有机相脱溶柱层析,流动相为体积配比为1:3的乙酸乙酯-石油醚,得到白色固体;

(c) 在250ml三口瓶中加入步骤(b)产物4.7g,无水乙醇150ml,室温下加入氢氧化钠6.0g,室温搅拌反应3~5h后,脱溶,加去离子水100ml,用6M盐酸调pH值至4,用乙酸乙酯100ml×2萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,脱溶得到白色固体产物;

(d) 在250ml单口瓶中加入步骤(c)产物3.0g,HOBt1.5g,乙酸乙酯100ml,室温搅拌反应0.5~1.5h,加入吗啉1.0g,EDCI2.0g,室温搅拌反应12h后,用水50ml×3洗涤,有机相脱溶后

产物用于下一步反应；

(e) 将步骤(d)产物加入250ml单口瓶中,加入二水合氯化亚锡10.0g,乙酸乙酯100ml,加热回流反应6h,待反应液冷却后,用饱和碳酸钾水溶液50ml×3洗涤,有机相脱溶柱层析纯化,流动相为体积配比为7:3的乙酸乙酯-石油醚,得到淡黄色固体即为烯酰吗啉氨基类似物,即本发明烯酰吗啉半抗原,进一步烘干,于4℃保存。

[0037] 所述烯酰吗啉特异性抗体为单克隆抗体,由烯酰吗啉半抗原-BSA偶联物免疫Balb/c小鼠得到。

[0038] 所述的烯酰吗啉半抗原-BSA偶联物的制备过程如下:

(a) 用0.1 M盐酸溶液配制4 mM浓度的烯酰吗啉半抗原,4℃搅拌,滴加1% NaNO<sub>2</sub>至过量,NaNO<sub>2</sub>用淀粉-碘化钾纸条监控,至溶液变蓝黑,继续反应15 min,所述百分含量为质量百分含量;

(b) 用pH为8.2,0.1 M碳酸盐缓冲液溶解BSA,BSA蛋白浓度为18.9 mg/mL;

(c) 将步骤(a)烯酰吗啉半抗原加入到步骤(b)的BSA中,调节pH至9.5,继续4℃搅拌2 h后,调节pH至9.0,用0.1mol/LPB透析两天,除去未反应的小分子物质,得到烯酰吗啉半抗原-BSA偶联物。

[0039] 所述的样品提取液为 20%N,N-二甲基甲酰胺水溶液,所述百分含量为体积百分含量。

[0040] 所述的样品复溶液为pH6.0,0.05mol/LMES缓冲液。

[0041] 所述的胶体金粒径为30 nm。

[0042] 所述的质控线上包被的抗抗体为羊抗鼠抗抗体。

[0043] 所述的检测试纸条还设置有塑料外盒,塑料外盒上对应样品吸收垫的上方设置有加样孔,塑料外盒上对应检测线和质控线上方设置有观察窗口。

[0044] 本发明所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒的应用为所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒在检测烟草中烯酰吗啉残留量中的应用。

[0045] 本发明烯酰吗啉特异性抗体选用单克隆抗体,同理适用于多克隆抗体。

[0046] 本发明烯酰吗啉胶体金检测试剂盒在37℃老化试验条件下,保存一个月,各项指标仍然符合检测要求。因此,在4-8℃下,至少可以保存12个月。

[0047] 实施例1

烟草样品中烯酰吗啉残留的检测

1、烟草样品的前处理过程

干烟草

称取均质的干烟草叶 $0.5 \pm 0.01$  g至4 mL离心管中,加入2 mL样品提取液,充分振荡2 min,室温静置5 min,待分层后,用一次性吸管吸取2滴上清液至0.5 mL离心管中,加入样品复溶液200  $\mu$ L,混匀待检。

[0048] 样品提取液为20%N,N-二甲基甲酰胺水溶液,百分含量为体积百分含量。

[0049] 样品复溶液为 pH6.0,0.05mol/LMES缓冲液。

[0050] 鲜烟草:

称取均质的鲜烟草叶 $1.0 \pm 0.05$  g至50 mL聚苯乙烯离心管中,加入4 mL样品提取液,充分振荡混合,室温静置2 min,吸取上清液用于分析。

[0051] 2、用烯酰吗啉胶体金检测试剂盒进行检测

用一次性吸管吸取待检烟草样品溶液50  $\mu\text{L}$ 垂直滴加于样品吸收垫,液体流动时开始计时,反应5~10 min,判定结果,其他时间判定无效。

[0052] 3、分析检测结果

阴性:检测线和质控线都显红色,表示样品中烯酰吗啉药物浓度低于检测限。

[0053] 阳性:检测线无显色或较质控线浅,质控线显色,表示样品中烯酰吗啉药物浓度等于或高于检测限。

[0054] 无效:未出现质控线,表明不正确的操作过程或试纸条已变质失效。在此情况下,应用新的试纸条重新测试。

[0055] 4、检测限试验

取空白烟草样品,在其中分别添加烯酰吗啉至终浓度为0、1、2、4  $\mu\text{g}/\text{g}$ ,取烯酰吗啉胶体金检测试纸条进行检测,每个样品重复测定五次。

[0056] 用试纸检测烟草样品时,当其中烯酰吗啉添加浓度为0、1  $\mu\text{g}/\text{g}$ 时,试纸条上显示出肉眼可见的两条红色线,呈阴性;当其中烯酰吗啉添加浓度为2、4  $\mu\text{g}/\text{g}$ 时,试纸条质控线显示红色,但检测线不显色,呈阳性;表明本试纸条对烟草中烯酰吗啉的检测限为2  $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

[0057] 5、假阳性率、假阴性率试验

取已知烯酰吗啉含量4  $\mu\text{g}/\text{g}$ 的烟草阳性样品50份和含量0  $\mu\text{g}/\text{g}$ 的烟草阴性样品50份,用试纸条进行检测。检测50份阴性样品时,试纸条检出0份阳性,假阳性率为0;检测50份阳性样品时,结果全部为阳性,假阴性率为0。本发明烯酰吗啉胶体金检测试剂盒检测假阳性率、假阴性率均符合检测标准要求,可以对烟草样品中烯酰吗啉进行检测。

[0058] 6、特异性试验

特异性是指抗体与结构不同的抗原决定簇发生结合的能力。

[0059] 本试纸条对烯酰吗啉检测限为2  $\mu\text{g}/\text{g}$ ,将烟草中常检的其他药物(氯氰菊酯、溴氰菊酯、氯氟氰菊酯、氰戊菊酯、功夫菊酯、胺菊酯、多菌灵、吡虫啉)用 pH7. 2、0. 2mol/L的磷酸盐缓冲液进行稀释,用本实施例中所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒进行检测,结果显示菊酯类、多菌灵、吡虫啉在100 $\mu\text{g}/\text{g}$ 浓度时,试纸条质控线和检测线均显色,可以得出本实施例的胶体金检测试剂盒产品未对这些药物发生交叉反应。本发明烯酰吗啉胶体金检测试剂盒产品可特异性检测烯酰吗啉药物。

[0060] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

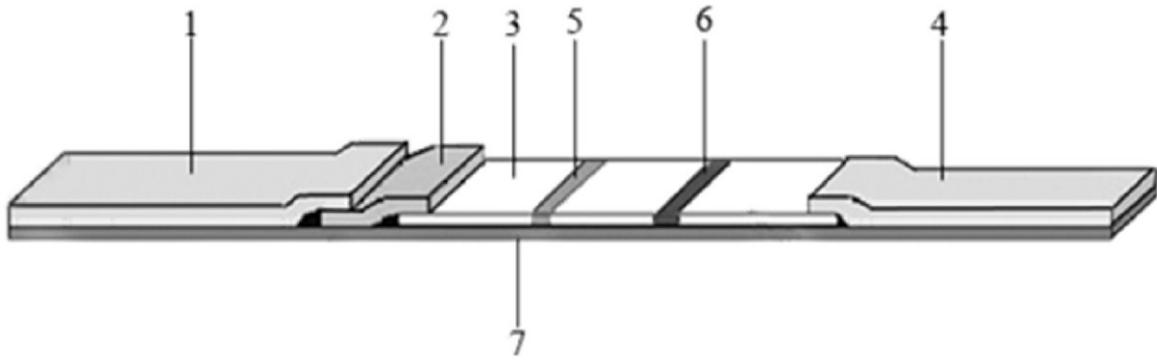


图1

专利名称(译)	一种烯酰吗啉胶体金试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110646603A</a>	公开(公告)日	2020-01-03
申请号	CN201910938841.X	申请日	2019-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	云南省烟草农业科学研究院		
申请(专利权)人(译)	云南省烟草农业科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	云南省烟草农业科学研究院		
[标]发明人	逢涛 李勇 师君丽 邓小鹏 李永平 罗贵昆 孔光辉		
发明人	逢涛 李勇 师君丽 邓小鹏 李永平 罗贵昆 孔光辉		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/537 G01N33/543 G01N21/78		
CPC分类号	G01N21/78 G01N33/531 G01N33/537 G01N33/543		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种烯酰吗啉胶体金检测试剂盒及其应用。所述的烯酰吗啉胶体金检测试剂盒包括试剂盒盒体、检测试纸条、样品提取液、样品复溶液；其中，所述检测试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫、PVC底板；所述结合物释放垫上包被有烯酰吗啉特异性抗体-胶体金标记物；所述反应膜上包被有烯酰吗啉半抗原-OVA偶联物构成的检测线和包被抗抗体构成的质控线。本发明烯酰吗啉胶体金检测试剂盒，能够实现对烟草中烯酰吗啉的半定量检测，具有检测快速，准确，便捷的优点，且能够同时检测大批量样本，能满足市场对烟草中烯酰吗啉残留的快速检测需求。

