



## (12)发明专利



(10)授权公告号 CN 107064494 B

(45)授权公告日 2019.12.24

(21)申请号 201710249636.3

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2017.04.17

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107064494 A

CN 106324240 A, 2017.01.11,

CN 103172674 A, 2013.06.26,

WO 2011139998 A2, 2011.11.10,

US 5576187 A, 1996.11.19,

US 5830770 A, 1998.11.03,

(43)申请公布日 2017.08.18

(73)专利权人 四川精卫食品检测科技有限公司

地址 620000 四川省眉山市经济开发区东  
区创业路1号

审查员 贾静

(72)发明人 蒲小容 何艳平 石洁 郭艳琴  
徐毓琴

(74)专利代理机构 成都睿道专利代理事务所  
(普通合伙) 51217

代理人 赵云

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种毒死蜱检测酶联免疫试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种毒死蜱检测酶联免疫试剂盒,包括酶标板、酶标记物工作液、毒死蜱特异性抗体浓缩液、洗涤工作液、复溶工作液和TMB显色液,其中,所述酶标板的微孔条上预包被毒死蜱偶联抗原,所述酶标记物工作液为酶标记抗抗体工作液。本发明毒死蜱检测酶联免疫试剂盒,是应用ELISA技术研发的新一代药物残留检测产品,与传统仪器分析技术相比,具有检测快速、简便、准确,低成本以及检测灵敏度高等特点,能最大限度地减少操作误差和工作强度。

1. 一种毒死蜱检测酶联免疫试剂盒,其特征在于:包括酶标板、酶标记物工作液、毒死蜱特异性抗体浓缩液、洗涤工作液、复溶工作液和TMB显色液,所述酶标板的微孔条上预包被毒死蜱偶联抗原,所述酶标记物工作液为酶标二抗工作液;具体如下:

(1) 洗涤工作液,浓缩洗涤液1:19体积比稀释而成,pH值为7.1~7.5,含有0.8%~1.2%吐温-20、0.01%~0.03%硫柳汞防腐剂、0.01~0.03mol/L的磷酸盐缓冲液,百分比为重量体积百分比;

(2) 复溶工作液,浓缩复溶液1:1体积比稀释而成,pH值为7.2~7.7,含有8%~12%卵清蛋白、0.1~0.4mol/L的磷酸盐缓冲液,百分比为重量体积百分比;

(3) TMB显色液,包括TMB底物液A液和TMB底物液B液,A液为过氧化氢,B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺;

(4) 终止液为0.5mol/L的盐酸;

(5) 酶标板采用96孔酶标板,在酶标板制备过程中所用的包被缓冲液为pH值9.6、0.05mol/L的碳酸盐缓冲液,所用封闭液为pH值9.1~9.5,含有3%~10%小牛血清、0.2%吐温-20、0.1~0.3mol/L的碳酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;

(6) 毒死蜱特异性抗体的制备流程为:将抗原注入到小鼠进行免疫反应,最终得到针对毒死蜱结构的抗体;

(7) 酶标二抗工作液,酶标二抗采用羊抗鼠抗抗体,以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原,对无病原体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体;

(8) 毒死蜱标准溶液,浓度分别为0 $\mu$ g/L、5 $\mu$ g/L、15 $\mu$ g/L、45 $\mu$ g/L、135 $\mu$ g/L和405 $\mu$ g/L;其中标准品稀释液为PH值7.4的0.02mol/L磷酸盐缓冲液;酶标板的制备过程为,用包被缓冲液将包被原稀释成0.1~0.2 $\mu$ g/ml,每孔加入100 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C温育2h或4 $^{\circ}$ C过夜,倾去包被液,用洗涤液洗涤2次,每次30s,拍干,然后在每孔中加入150~200 $\mu$ l封闭液37 $^{\circ}$ C温育1~2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空;毒死蜱免疫抗原制备方法为:将毒死蜱0.7g加热下溶解于20mL无水甲醇中,加入0.16g盐酸羟胺进行,加入1g氢氧化钾作为催化剂,加热80 $^{\circ}$ C回流反应,薄层色谱监测反应的进行,反应完成后,硅胶柱净化、提纯反应产物0.65g,将0.65g产物溶于无水四氢呋喃中,加入0.21g丁二酸酐,加入0.1gDMAP(4-二甲氨基吡啶)作为催化剂,用薄层色谱监测反应的进行;在该反应中,毒死蜱与丁二酸酐的摩尔比为1:1.2;称取以上半抗原0.1g,分别溶解于3mLN,N-二甲基甲酰胺溶液,分别加入NHS(N-羟基丁二酰亚胺)/EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)混合水溶液,活化4小时;活化后溶液分别加入到BSA牛血清白蛋白溶液中,所述BSA牛血清白蛋白溶液中含BSA220mg,调PH8.5左右,室温反应24小时,转到透析袋中于PB中溶液中透析3天,PB为0.02mol/L磷酸盐缓冲液,每天早晚换液。

## 一种毒死蜱检测酶联免疫试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种毒死蜱检测酶联免疫试剂盒,属于生物工程技术领域。

### 背景技术

[0002] 毒死蜱(Chlorpyrifos)中文别名:氯吡硫磷;乐斯本;白蚁清;氯吡磷,高效、广谱有机磷杀虫剂—毒死蜱,对害虫具有触杀、胃毒和熏蒸作用,尤其对褐飞虱的防治有非常好的效果。现有国标等相关检测方法为气相、液相或气质连用等方法,该类方法仪器设备采购成本高,人员要求高、试剂耗材昂贵、检测周期长。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种毒死蜱检测酶联免疫试剂盒,以便更好地实现检测,提供检测效率、准确率,改善其使用效果。

[0004] 为了实现上述目的,本发明的技术方案如下。

[0005] 一种毒死蜱检测酶联免疫试剂盒,包括酶标板、酶标记物工作液、毒死蜱特异性抗体浓缩液、洗涤工作液、复溶工作液和TMB显色液,其中,所述酶标板的微孔条上预包被毒死蜱偶联抗原,所述酶标记物工作液为酶标记抗抗体工作液;具体如下:

[0006] (1) 洗涤工作液,浓缩洗涤液1:19体积比稀释而成,pH值为7.1~7.5,含有0.8%~1.2%吐温-20、0.01‰~0.03‰硫柳汞防腐剂、0.01~0.03mol/L的磷酸盐缓冲液,百分比为重量体积百分比;

[0007] (2) 复溶工作液,浓缩复溶液1:1体积比稀释而成,pH值为7.2~7.7,含有8%~12%卵清蛋白、0.1~0.4mol/L的磷酸盐缓冲液,百分比为重量体积百分比;

[0008] (3) TMB显色液,包括TMB底物液A液和TMB底物液B液,A液为过氧化氢,B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺;

[0009] (4) 终止液为0.5mol/L的盐酸缓冲液;

[0010] (5) 酶标板采用96孔酶标板,在酶标板制备过程中所用的包被缓冲液为pH值9.6、0.05mol/L的碳酸盐缓冲液,所用封闭液为pH值9.1~9.5,含有3%~10%小牛血清、0.2%吐温-20、0.1~0.3mol/L的碳酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;

[0011] (6) 毒死蜱特异性抗体的制备流程为:将这两种抗原注入到小鼠进行免疫反应,最终得到两种针对不同毒死蜱结构的抗体;

[0012] (7) 酶标二抗工作液,本实施例酶标二抗采用羊抗鼠抗抗体,以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原,对无病原体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体;

[0013] (8) 毒死蜱标准溶液,浓度分别为0μg/L、5μg/L、15μg/L、45μg/L、135μg/L和405μg/L;其中标准品稀释液为PH值7.4的0.02mol/L磷酸盐缓冲液。

[0014] 进一步地,酶标板的制备过程为,用包被缓冲液将包被原稀释成0.1~0.2μg/ml,每孔加入100μl,37℃温育2h或4℃过夜,倾去包被液,用洗涤液洗涤2次,每次30s,拍干,然后在每孔中加入150~200μl封闭液37℃温育1~2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真

空。

[0015] 进一步地, 毒死蜱免疫抗原制备方法为: 将毒死蜱0.7g加热下溶解于20mL无水甲醇中, 加入0.16g盐酸羟胺进行, 加入1g氢氧化钾作为催化剂, 加热80℃回流反应, 薄层色谱监测反应的进行, 反应完成后, 硅胶柱净化、提纯反应产物0.65g, 将0.65g产物溶于无水四氢呋喃中, 加入0.21g丁二酸酐, 加入0.1gDMAP (4-二甲氨基吡啶) 作为催化剂, 用薄层色谱监测反应的进行; 在该反应中, 毒死蜱与丁二酸酐的摩尔比为1:1.2; 称取以上半抗原0.1g, 分别溶解于3mLN,N-二甲基甲酰胺溶液, 分别加入NHS (N-羟基丁二酰亚胺) /EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐) 混合水溶液, 活化4小时; 活化后溶液分别加入到BSA (牛血清白蛋白) 溶液(含BSA220mg), 调PH8.5左右, 室温反应24小时, 转到透析袋中于PB (0.02mol/L磷酸盐缓冲溶液) 溶液中透析3天, 每天早晚换液。

[0016] 该发明的有益效果在于: 本发明毒死蜱检测酶联免疫试剂盒, 是应用ELISA技术研发的新一代药物残留检测产品, 与传统仪器分析技术相比, 具有检测快速、简便、准确, 低成本以及检测灵敏度高等特点, 能最大限度地减少操作误差和工作强度。

### 具体实施方式

[0017] 下面结合实施例对本发明的具体实施方式进行描述, 以便更好的理解本发明。

[0018] 实施例

[0019] 一种毒死蜱检测酶联免疫试剂盒, 包括酶标板、酶标记物工作液、毒死蜱特异性抗体浓缩液、洗涤工作液、复溶工作液和TMB显色液, 其中, 所述酶标板的微孔条上预包被毒死蜱偶联抗原, 所述酶标记物工作液为酶标记抗抗体工作液; 具体如下:

[0020] (1) 洗涤工作液, 浓缩洗涤液1:19体积比稀释而成, pH值为7.1~7.5, 含有0.8%~1.2%吐温-20、0.01%~0.03%硫柳汞防腐剂、0.01~0.03mol/L的磷酸盐缓冲液, 百分比为重量体积百分比;

[0021] (2) 复溶工作液, 浓缩复溶液1:1体积比稀释而成, pH值为7.2~7.7, 含有8%~12% 卵清蛋白、0.1~0.4mol/L的磷酸盐缓冲液, 百分比为重量体积百分比;

[0022] (3) TMB显色液, 包括TMB底物液A液和TMB底物液B液, A液为过氧化氢, B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺;

[0023] (4) 终止液为0.5mol/L的盐酸缓冲液;

[0024] (5) 酶标板采用96孔酶标板, 在酶标板制备过程中所用的包被缓冲液为pH值9.6、0.05mol/L的碳酸盐缓冲液, 所用封闭液为pH值9.1~9.5, 含有3%~10%小牛血清、0.2%吐温-20、0.1~0.3mol/L的碳酸盐缓冲液, 所述百分比为重量体积百分比; 酶标板的制备过程为, 用包被缓冲液将包被原稀释成0.1~0.2μg/ml, 每孔加入100μl, 37℃温育2h或4℃过夜, 倾去包被液, 用洗涤液洗涤2次, 每次30s, 拍干, 然后在每孔中加入150~200μl封闭液37℃温育1~2h, 倾去孔内液体拍干, 干燥后用铝膜真空;

[0025] 毒死蜱免疫抗原制备方法为: 将毒死蜱0.7g加热下溶解于20mL无水甲醇中, 加入0.16g盐酸羟胺进行, 加入1g氢氧化钾作为催化剂, 加热80℃回流反应, 薄层色谱监测反应的进行, 反应完成后, 硅胶柱净化、提纯反应产物0.65g, 将0.65g产物溶于无水四氢呋喃中, 加入0.21g丁二酸酐, 加入0.1gDMAP (4-二甲氨基吡啶) 作为催化剂, 用薄层色谱监测反应的进行。在该反应中, 毒死蜱与丁二酸酐的摩尔比为1:1.2。

[0026] 称取以上半抗原0.1g,分别溶解于3mLN,N-二甲基甲酰胺溶液,分别加入NHS (N-羧基丁二酰亚胺)/EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐) 混合水溶液,活化4小时;活化后溶液分别加入到BSA(牛血清白蛋白)溶液中(含BSA220mg),调PH8.5左右,室温反应24小时,转到透析袋中于PB (0.02mol/L磷酸盐缓冲溶液中) 溶液中透析3天,每天早晚换液。得到的两种抗原。同上方法可以两种不同的包被原,实验证明两种方法所得到的抗体均能特异性识别、检测小分子农药毒死蜱。

[0027] (6) 毒死蜱特异性抗体的制备流程为:将这两种抗原注入到小鼠进行免疫反应,最终得到两种针对不同毒死蜱结构的抗体。

[0028] (7) 酶标二抗工作液,本实施例酶标二抗采用羊抗鼠抗抗体,以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原,对无病原体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体。本实施例为酶标记的鼠抗抗体,本实施例的标记酶为辣根过氧化物酶,标记酶酶标记的羊抗鼠抗抗体是采用戊二醛法将标记酶与抗抗体进行偶联得到;

[0029] 酶标二抗通过稀释,酶标二抗得到工作液,稀释处理同现有技术;

[0030] (8) 毒死蜱标准溶液,浓度分别为0 $\mu$ g/L、5 $\mu$ g/L、15 $\mu$ g/L、45 $\mu$ g/L、135 $\mu$ g/L和405 $\mu$ g/L。

[0031] 其中标准品稀释液为PH值7.4的0.02mol/L磷酸盐缓冲液。

[0032] 针对上述样品进行以下检测:

[0033] (1) 检测限测试:

[0034] 表1产品检测限测定

[0035]

样本	添加值	实测值 ( $\mu$ g/g)					平均值
白菜	0.500	0.50	0.50	0.51	0.52	0.51	0.508
苹果	0.500	0.52	0.50	0.51	0.54	0.51	0.516
烟叶	0.500	0.52	0.50	0.52	0.53	0.51	0.516

[0036] (2) 精密度测试:

[0037] 表2蔬菜样本精密度测定(添加1 $\mu$ g/g)

[0038]

批次	实测值 ( $\mu$ g/g)					变异系数 CV%
1	0.95	0.98	1.02	1.03	0.96	3.18%
2	1.01	1.0	0.95	0.96	1.02	3.18%
3	1.03	0.99	0.97	1.01	1.0	2.0%

[0039] (3) 准确率测试

[0040] 表3蔬菜样本准确度测定(添加1 $\mu$ g/g)

[0041]

样品	添加回收率测定 (%)			平均值 (%)
样品 1	93.2%	94.6%	103.2%	97.00%
样品 2	93.7%	91.4%	95.5%	93.53%
样品 3	103.7%	105.5%	108.3%	105.83%
样品 4	91.8%	92.7%	98.3%	94.27%
样品 5	99.6%	104.7%	102.3%	102.20%
平均值	96.40%	97.78%	101.52%	98.57%

[0042] (4) 特异性测试 (交叉反应率) :

[0043] 交叉反应率试验: 选择其他类农药药物测定交叉反应率, 通过各种药物的标准曲线分别得到其 50% 抑制浓度 (即 IC<sub>50</sub>), 交叉反应率 (%) = (毒死蜱 IC<sub>50</sub> / 其他类农药 IC<sub>50</sub>) × 100%, 结果见表 4。

[0044] 表 4 交叉反应率测定

[0045]	药物名称	交叉反应率 (%)
	毒死蜱	100%

[0046]	敌敌畏	小于 1%
	吡虫啉	小于 1%
	高效氯氟氰菊酯	小于 1%

[0047] (5) 产品稳定性测试:

[0048] 试剂盒保存性试验: 试剂盒保存条件为 2~8℃, 经过 12 个月的测定, 试剂盒的最大吸光度值 (零标准)、50% 抑制浓度、毒死蜱添加实际测定值均在正常范围之内。结果见表 5

[0049] 表 5 试剂产品稳定性保存记录表

[0050]

日期/参数	0 标 OD 值	50% 抑制 浓 度	第二标准抑 制率	线性	添 加 回 收 (1 $\mu$ g/g)
保存前	1.895	18	75%	0.995	0.96
第一个月	1.845	19	73%	0.998	0.98
第三个月	1.945	21	79%	0.991	1.02
第六个月	1.745	17	70%	0.995	0.89
第九个月	1.724	20	78%	0.993	0.95
第十二个月	1.545	15	68%	0.995	0.92

[0051] 以上所述是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也视为本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种毒死蜱检测酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN107064494B</a>	公开(公告)日	2019-12-24
申请号	CN201710249636.3	申请日	2017-04-17
[标]发明人	蒲小容 何艳平 石洁 郭艳琴 徐毓琴		
发明人	蒲小容 何艳平 石洁 郭艳琴 徐毓琴		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/543 G01N2430/10		
代理人(译)	赵云		
审查员(译)	贾静		
其他公开文献	CN107064494A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种毒死蜱检测酶联免疫试剂盒，包括酶标板、酶标记物工作液、毒死蜱特异性抗体浓缩液、洗涤工作液、复溶工作液和TMB显色液，其中，所述酶标板的微孔条上预包被毒死蜱偶联抗原，所述酶标记物工作液为酶标记抗体工作液。本发明毒死蜱检测酶联免疫试剂盒，是应用ELISA技术研发的新一代药物残留检测产品，与传统仪器分析技术相比，具有检测快速、简便、准确，低成本以及检测灵敏度高等特点，能最大限度地减少操作误差和工作强度。

样本	添加 值	实测值 (μg/g)					平均值
白菜	0.500	0.50	0.50	0.51	0.52	0.51	0.508
苹果	0.500	0.52	0.50	0.51	0.54	0.51	0.516
烟叶	0.500	0.52	0.50	0.52	0.53	0.51	0.516