



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110850090 A

(43)申请公布日 2020.02.28

(21)申请号 201911020025.7

(22)申请日 2019.10.25

(71)申请人 成都市房屋安全事务中心

地址 610015 四川省成都市青羊区人民中路一段28号

(72)发明人 张亮 贾慧娴 熊先贵 彭凯俊
万宇平 王思忠 曾小虎 崔海峰
崔娜

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

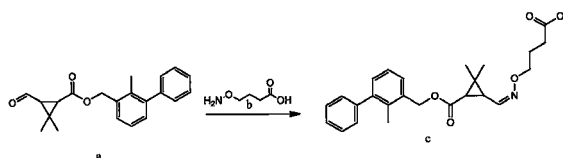
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种检测联苯菊酯的试纸条及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种检测联苯菊酯的试纸条及其应用。试纸条包括样品吸收垫(1)、结合物释放垫(2)、反应膜(3)、吸水垫(4)和底板(7),所述反应膜上具有包被有联苯菊酯半抗原-载体蛋白偶联物的检测线(5)和包被有羊抗鼠抗体的质控线(6),所述结合物释放垫(2)喷涂有联苯菊酯单克隆抗体-胶体金标记物。本发明还提供了一种应用上述联苯菊酯试纸条检测土壤及门窗洞等砌体墙中联苯菊酯残留的方法。本发明所提供的试纸条具有操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低等特点,适合大量样本的筛查和现场监控。



1. 一种检测联苯菊酯的试纸条,包括样品吸收垫(1)、结合物释放垫(2)、反应膜(3)、吸水垫(4)和底板(7),其特征在于所述反应膜上具有包被有联苯菊酯半抗原-载体蛋白偶联物的检测线(5)和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线(6),所述结合物释放垫(2)喷涂有联苯菊酯单克隆抗体-胶体金标记物,所述联苯菊酯半抗原的制备方法如下:

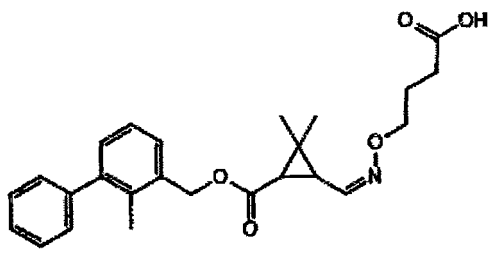
取化合物a 0.322g,加甲醇30ml溶解,澄清,标为A液,取化合物b 0.155g,加水2ml溶解,加入到A液中,室温搅拌2h,停止反应,旋蒸,除去甲醇,加水60ml,乙酸乙酯80ml萃取,分去水相,有机相浓缩蒸干,上硅胶柱,石油醚/乙酸乙酯(v/v,5/1)洗脱分离,得到联苯菊酯半抗原产物化合物c 0.38g,收率89.83%。

2. 如权利要求1所述的试纸条,其特征在于所述样品吸收垫(1)、结合物释放垫(2)、反应膜(3)、吸水垫(4)依次粘贴在底板(7)上。

3. 如权利要求1-2任一项所述的试纸条,其特征在于所述结合物释放垫1/3~1/2被覆盖于样品吸收垫下。

4. 如权利要求1所述的试纸条,其特征在于所述联苯菊酯半抗原-载体蛋白偶联物由联苯菊酯半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

5. 如权利要求1或4任一项所述的试纸条,其特征在于所述联苯菊酯半抗原是由化学反应得到,其分子结构式为:



6. 如权利要求1所述的试纸条,其特征在于所述联苯菊酯单克隆抗体是以联苯菊酯半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述羊抗鼠抗抗体是将鼠源抗体免疫羊得到。

7. 一种制备权利要求1-6任一项所述试纸条的方法,其包括步骤:

- 1) 制备喷涂有联苯菊酯单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;
- 2) 制备具有包被有联苯菊酯半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线的反应膜;
- 3) 将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和底板组装成试纸条。

8. 一种检测土壤及门窗洞等砌体墙中联苯菊酯残留的方法,其包括步骤:

- 1) 样本前处理;
- 2) 用权利要求1-6任一项所述的试纸条进行检测;
- 3) 分析检测结果。

一种检测联苯菊酯的试纸条及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测联苯菊酯的试纸条及其应用,具体涉及一种用于检测联苯菊酯的胶体金试纸条,其特别适用于土壤及门窗洞等砌体墙中联苯菊酯残留的快速定性、定量检测。

背景技术

[0002] 联苯菊酯,又称为天王星,虫螨灵,毕芬宁,是一种高效合成除虫菊酯杀虫杀螨剂,具有触杀、胃毒作用,无内吸、熏蒸作用。杀虫谱广,对螨也有较好防效。作用迅速,在土壤中不移动,属于高效低毒农药,但其残留仍能引起人畜中毒,严重危害人类健康。

[0003] 由于不同的配比有不同的作用,同时卫生杀虫剂是防治害虫的化工产品,主要应用于人类居住的生活环境,直接关系到人们的身体健康和生命安全。在南方地区,该药物经常用于防治白蚁,当联苯菊酯含量低于15ppm时,则未达到标准,无法起到药物屏障作用;当联苯菊酯含量高于87ppm时,则浓度超标,造成土壤污染。因此,本申请对联苯菊酯残留量的检测方法具有实际意义,检测范围能够检测15ppm/87ppm。尤其是快速检测方法的建立将有利于提高监管手段和监督水平。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种灵敏度高、操作简单、成本低、检测时间短的联苯菊酯残留检测试纸条。

[0005] 本发明所提供的检测联苯菊酯残留的试纸条,包括样品吸收垫(1)、结合物释放垫(2)、反应膜(3)、吸水垫(4)和底板(7);所述反应膜上具有包被有联苯菊酯半抗原-载体蛋白偶联物的检测线(5)和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线(6),所述结合物释放垫(2)喷涂有联苯菊酯单克隆抗体-胶体金标记物。

[0006] 所述联苯菊酯半抗原-载体蛋白偶联物是由联苯菊酯半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

[0007] 所述联苯菊酯单克隆抗体是以联苯菊酯半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,是由联苯菊酯单克隆抗体杂交瘤细胞株分泌获得;所述羊抗鼠抗抗体是将鼠源抗体免疫羊得到。

[0008] 所述样品吸收垫(1)、结合物释放垫(2)、反应膜(3)、吸水垫(4)依次粘贴在底板(7)上,所述结合物释放垫1/3~1/2被覆盖于样品吸收垫下。

[0009] 所述底板可为PVC底板或其他硬质不吸水的材料;所述样品吸收垫可为吸滤纸或滤油纸;所述结合物释放垫可为玻璃棉或聚酯材料;所述吸水垫为吸水纸;所述反应膜可为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜。

[0010] 本发明的另一个目的是提供一种制备上述试纸条的方法,其包括步骤:

[0011] 1) 制备喷涂有联苯菊酯单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0012] 2) 制备具有包被有联苯菊酯半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗

抗体的质控线的反应膜；

[0013] 3) 将1) 和2) 制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和底板组装成试纸条。

[0014] 具体地说,步骤包括:

[0015] 1) 半抗原制备:将化学反应得到联苯菊酯半抗原;

[0016] 2) 将联苯菊酯半抗原与载体蛋白偶联,得到联苯菊酯半抗原-载体蛋白偶联物;

[0017] 3) 用联苯菊酯半抗原-载体蛋白偶联物免疫小鼠,将小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到联苯菊酯单克隆杂交瘤细胞株;

[0018] 4) 提取小鼠IgG免疫健康山羊,得到羊抗鼠抗抗体;

[0019] 5) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

[0020] 6) 将步骤3) 制备的联苯菊酯单克隆抗体加入步骤5) 制备的胶体金中,得到联苯菊酯单克隆抗体-胶体金标记物;

[0021] 7) 将联苯菊酯单克隆抗体-胶体金标记物喷涂在结合物释放垫上,37℃烘1h后取出,置于干燥环境中保存备用;

[0022] 8) 将联苯菊酯半抗原-载体蛋白偶联物包被在反应膜上构成检测线,将羊抗鼠抗抗体包被在反应膜上构成质控线;

[0023] 9) 将样品吸收垫用含0.5%牛血清白蛋白(体积分数)、pH为7.2、0.1mol/L磷酸盐缓冲液浸泡2h,37℃下烘干2h;

[0024] 10) 在底板上按顺序粘贴上样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫,样品吸收垫盖住结合物释放垫,最后切成3mm宽的小条,加塑料盒,真空包装,4~30℃条件下可保存12个月。

[0025] 本发明的另一个目的是提供一种应用上述试纸条检测蔬菜及农作物中联苯菊酯残留的方法,它包括步骤:

[0026] (1) 样品前处理;

[0027] (2) 用试纸条进行检测;

[0028] (3) 分析检测结果。

[0029] 本发明的联苯菊酯快速检测试纸条采用高度特异性的抗体抗原反应及竞争抑制免疫层析分析技术,将联苯菊酯单克隆抗体-胶体金标记物固定于结合物释放垫上,样品中的联苯菊酯在流动过程中,与结合物释放垫上的联苯菊酯单克隆抗体-胶体金标记物结合,形成药物-抗体-胶体金标记物。样本中的药物与反应膜检测线上的联苯菊酯半抗原-载体蛋白偶联物竞争结合联苯菊酯单克隆抗体-胶体金标记物,根据检测线红色条带有无或颜色深浅来判断待测样品液中是否含有联苯菊酯残留。

[0030] 检测时,样品经处理后滴入试纸条孔内,当联苯菊酯在样品中的浓度低于检测限或为零时,单克隆抗体-胶体金标记物在层析过程中会与固定在反应膜上的联苯菊酯半抗原-载体蛋白偶联物结合,在检测线(T) 和质控线(C) 内各出现一条红色条带;如果联苯菊酯在样品中的浓度等于或高于检测限,单克隆抗体-胶体金标记物会与联苯菊酯全部结合,从而在T线处因为竞争反应不会与联苯菊酯半抗原-载体蛋白偶联物结合而不出现红色条带。

[0031] 本发明的试纸条具有灵敏度高、特异性强、成本低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点。用本发明试纸条检测联苯菊酯残留的方法简便、

快速、直观、准确、适用范围广、成本低、易推广使用。

附图说明

[0032] 图1为联苯菊酯半抗原合成图。

[0033] 图2为试纸条剖面结构示意图。

具体实施方式

[0034] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0035] 实施例1 联苯菊酯检测试纸条的制备

[0036] 该试纸条的制备方法主要包括以下步骤:

[0037] 1) 制备喷涂有联苯菊酯单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0038] 2) 制备具有包被有联苯菊酯半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线的反应膜;

[0039] 3) 将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和PVC底板组装成试纸条。

[0040] 下面分步详细叙述:

[0041] 1、联苯菊酯半抗原的制备

[0042] 取化合物a 0.322g,加甲醇30ml溶解,澄清,标为A液,取化合物b 0.155g,加水2ml溶解,加入到A液中,室温搅拌2h,停止反应,旋蒸,除去甲醇,加水60ml,乙酸乙酯80ml萃取,分去水相,有机相浓缩蒸干,上硅胶柱,石油醚/乙酸乙酯(v/v,5/1)洗脱分离,得到联苯菊酯半抗原产物化合物c 0.38g,收率89.83%。

[0043] 2、免疫原的制备

[0044] 取联苯菊酯半抗原16mg,加DMF 1ml溶解,澄清,加EDC 14.2mg,加NHS 9.87mg,室温反应2h,得到半抗原活化液A液;取牛血清白蛋白(BSA),加0.05M PB缓冲液溶解,得到B液,将A液滴加到B液中,室温反应4h,0.02M PBS透析纯化3天,每天换液3次,离心分装,得到联苯菊酯-BSA偶联物,即为免疫原,-20℃保存,备用。

[0045] 3、包被原的制备

[0046] 取联苯菊酯半抗原18mg,加DMF 1ml溶解,澄清,加EDC 16mg,加NHS 14mg,室温反应2h,得到半抗原活化液A液;取卵血清白蛋白(OVA),加0.05M PB缓冲液溶解,得到B液,将A液滴加到B液中,室温反应4h,0.02M PBS透析纯化3天,每天换液3次,离心分装,得到联苯菊酯-OVA偶联物,即为包被原,-20℃保存,备用。

[0047] 4、联苯菊酯单克隆抗体的制备

[0048] (1) 动物免疫

[0049] 将步骤2得到的免疫原注入Balb/c小鼠体内,免疫剂量为150μg/只,使其产生抗血清。

[0050] (2) 细胞融合和克隆化

[0051] 取免疫Balb/c小鼠脾细胞,按8:1(数量配比)比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争ELISA法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直

到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0052] (3) 细胞冻存和复苏

[0053] 将杂交瘤细胞用冻存液制成 1×10^6 个/ml的细胞悬液,在液氮中长期保存。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。

[0054] (4) 单克隆抗体的制备与纯化

[0055] 增量培养法:将杂交瘤细胞置于细胞培养基中,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,-20℃保存。

[0056] 所述细胞培养基为向RPMI1640培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠,使小牛血清在细胞培养基中的终浓度为20% (质量分数),碳酸氢钠在细胞培养基中的终浓度为0.2% (质量分数);所述细胞培养基的pH为7.4。

[0057] 5、羊抗鼠抗抗体的制备

[0058] 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。

[0059] 6、联苯菊酯单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0060] (1) 胶体金的制备

[0061] 用双蒸去离子水将1%氯金酸稀释成0.01% (质量分数),取100ml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2.5ml 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,4℃保存。制备好的胶体金外观纯净、透亮、无沉淀和漂浮物。

[0062] (2) 联苯菊酯单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0063] 在磁力搅拌下,用0.2mol/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20~50μg的标准向胶体金溶液中加入联苯菊酯单克隆抗体,继续搅拌混匀30min,加入10%BSA,使其在胶体金溶液中的终浓度为1% (体积分数),静置10min。12000r/min、4℃离心40min,弃上清液,沉淀用复溶缓冲液洗涤两次,用体积为初始胶体金体积1/10的复溶缓冲液将沉淀重悬,置4℃备用。

[0064] 复溶缓冲液:含酪蛋白0.02%~0.1% (质量分数)、吐温-80 0.05%~0.2% (质量分数)、pH7.2的0.02mol/L磷酸盐缓冲液。

[0065] 7、结合物释放垫的制备

[0066] 将结合物释放垫浸泡于含有牛血清白蛋白(牛血清白蛋白在缓冲液中的浓度为0.5%)、pH为7.2、0.5mol/L的磷酸盐缓冲液中,均匀浸湿1h,37℃烘3h备用。用Isoflow喷膜仪将制备好的联苯菊酯单克隆抗体-胶体金标记物均匀喷涂在结合物释放垫上,每1cm结合物释放垫喷涂0.01ml联苯菊酯单克隆抗体-胶体金标记物后,置于37℃环境中(湿度<20%) 60min后取出,置于干燥环境(湿度<20%)中保存备用。

[0067] 8、反应膜的制备

[0068] 将联苯菊酯半抗原-卵清蛋白偶联物包被到反应膜上构成检测线,将羊抗鼠抗抗体包被在反应膜上构成质控线。

[0069] 包被过程:用磷酸缓冲液将联苯菊酯半抗原-卵清蛋白偶联物稀释到10mg/ml,用Isoflow点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测线(T线),包被量为0.8μl/cm;用0.01mol/L、pH7.4的磷酸盐缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释到200μg/ml,用Isoflow点膜仪将其

包被于硝酸纤维素膜上的质控线(C线),包被量为 $1.0\mu\text{l}/\text{cm}$ 。将包被好的反应膜置于 37°C 条件下干燥2h,备用。

[0070] 9、样品吸收垫的制备

[0071] 将样品吸收垫置于含0.5%牛血清白蛋白(体积分数)、 $\text{pH}7.2$ 、 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液中浸泡2h, 37°C 烘2h备用。

[0072] 10、试纸条的组装

[0073] 将样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次按顺序粘贴在PVC底板上;结合物释放垫从起始端有 $1/3$ 区域被样品吸收垫覆盖,结合物释放垫的末端与反应膜的始端连接,反应膜的末端与吸水垫的始端相连,样品吸收垫的始端与PVC底板的始端对齐,吸水垫的末端与PVC底板的末端对齐;所述反应膜上有检测线和质控线,检测线(T线)和质控线(C线)均为与所述试纸条的长相垂直的条状带;检测线位于靠近结合物释放垫的末端的一侧;质控线位于远离结合物释放垫的末端的一侧;将试纸条用机器切成 3mm 宽的小条,装在特制的塑料制卡中, $4\sim 30^{\circ}\text{C}$ 条件下可保存12个月。

[0074] 实施例2 样品中联苯菊酯残留的检测

[0075] 1、用试纸条进行检测

[0076] 用吸管吸取待检样品溶液垂直滴加3滴于加样孔,液体流动时开始计时,反应 $5\sim 10\text{min}$,判定结果。

[0077] 2、分析检测结果

[0078] 通过胶体金分析仪(简称“分析仪”)读取结果:

[0079] 阴性(-):表示样品中待测物质浓度低于检测限;

[0080] 阳性(+):表示样品中待测物质浓度等于或高于检测限;

[0081] 无效:表示需要重新测试。

[0082] 实施例3 样品检测实例

[0083] 1、检测限试验

[0084] 取空白土壤及门窗洞样本,在其中分别添加联苯菊酯至终浓度为 7.5 、 15 、 $30\text{mg}/\text{kg}$,取试纸条进行检测,每个样本重复测定三次。

[0085] 用试纸条检测土壤及门窗洞样本时,当其中联苯菊酯添加浓度为 $7.5\text{mg}/\text{kg}$ 时,分析仪显示为阴性;当其中联苯菊酯添加浓度为 15 、 $30\text{mg}/\text{kg}$ 时,分析仪显示为阳性。

[0086] 2、假阳性率、假阴性率试验

[0087] 取已知联苯菊酯含量为 $15\text{mg}/\text{kg}$ 的土壤、门窗洞阳性样本各20份和含量小于 $15\text{mg}/\text{kg}$ 的土壤、门窗洞阴性样本各20份,用三批试纸条进行检测,进行定性和定量两种方法的判定,计算其阴阳性率。结果见表1,表2。

[0088] 表1 土壤检测样本结果

	浓度 批次	阳性样本 (20 份)	阴性样本 (20 份)
[0089]	1	20 份阳性	20 份阴性
	2	20 份阳性	20 份阴性
	3	20 份阳性	20 份阴性

[0090] 表2 门窗洞检测样本结果

	<div>浓度 批次</div>	阳性样本 (20 份)	阴性样本 (20 份)
[0091]	1	20 份阳性	20 份阴性
	2	20 份阳性	20 份阴性
	3	20 份阳性	20 份阴性

[0092] 结果表明：用3个批次生产的试纸条检测阳性土壤及门窗洞样本时，定性和定量两种方法的结果一致，即全为阳性，可知阳性样本符合率为100%，假阴性率为0；检测20份阴性土壤及门窗洞样本时，定性和定量两种方法的结果一致，即全为阴性，可知阴性符合率为100%，假阳性率为0。说明本发明的检测联苯菊酯的试纸条可以对土壤及门窗洞中联苯菊酯残留进行快速检测。

[0093] 3、特异性试验

[0094] 用联苯菊酯试纸条检测500mg/kg氯氰菊酯、氰戊菊酯和溴氰菊酯等药物。结果显示，试纸条质控线和检测线均显色，呈阴性。说明本试纸条对500mg/kg氯氰菊酯、氰戊菊酯和溴氰菊酯等药物无交叉反应。

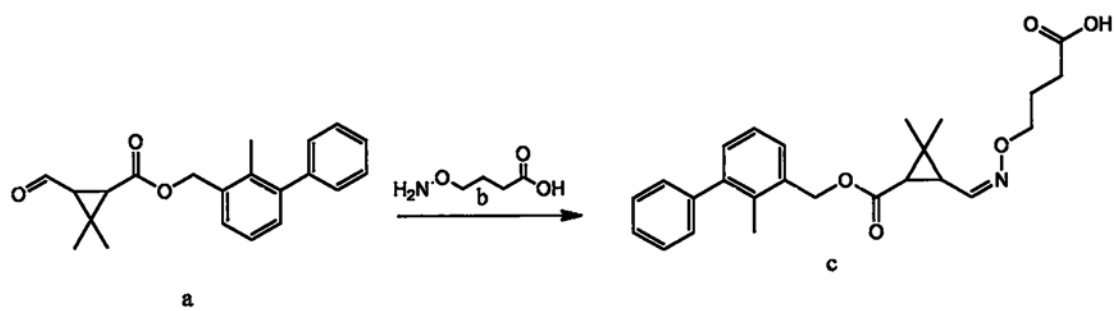


图1

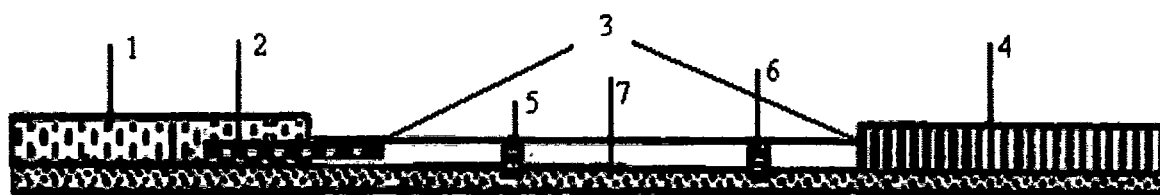


图2

专利名称(译)	一种检测联苯菊酯的试纸条及其应用		
公开(公告)号	CN110850090A	公开(公告)日	2020-02-28
申请号	CN201911020025.7	申请日	2019-10-25
[标]发明人	张亮 万宇平 王思忠 曾小虎 崔海峰 崔娜		
发明人	张亮 贾慧娴 熊先贵 彭凯俊 万宇平 王思忠 曾小虎 崔海峰 崔娜		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5308 G01N33/558 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测联苯菊酯的试纸条及其应用。试纸条包括样品吸收垫(1)、结合物释放垫(2)、反应膜(3)、吸水垫(4)和底板(7)，所述反应膜上具有包被有联苯菊酯半抗原-载体蛋白偶联物的检测线(5)和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线(6)，所述结合物释放垫(2)喷涂有联苯菊酯单克隆抗体-胶体金标记物。本发明还提供了一种应用上述联苯菊酯试纸条检测土壤及门窗洞等砌体墙中联苯菊酯残留的方法。本发明所提供的试纸条具有操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低等特点，适合大量样本的筛查和现场监控。

