



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106324243 B

(45)授权公告日 2018.07.13

(21)申请号 201610711306.7

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2016.08.23

G01N 33/543(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106324243 A

(56)对比文件

CN 102539753 A,2012.07.04,

CN 104034886 A,2014.09.10,

CN 102411051 A,2012.04.11,

CN 101477116 A,2009.07.08,

CN 102718861 A,2012.10.10,

CN 105785021 A,2016.07.20,

CN 101477118 A,2009.07.08,

CN 105606800 A,2016.05.25,

CN 202216956 U,2012.05.09,

CN 105785021 A,2016.07.20,

CN 101162231 A,2008.04.16,

(43)申请公布日 2017.01.11

(73)专利权人 广东志道医药科技有限公司

地址 528051 广东省佛山市禅城区张槎一路127号1座3层P11

专利权人 广州安诺食品科学技术有限公司

(72)发明人 冯锐 龙飞 杨鹏博 杨松林

罗莉妮

审查员 舒霏霏

(74)专利代理机构 重庆百润洪知识产权代理有限公司 50219

代理人 高姜

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

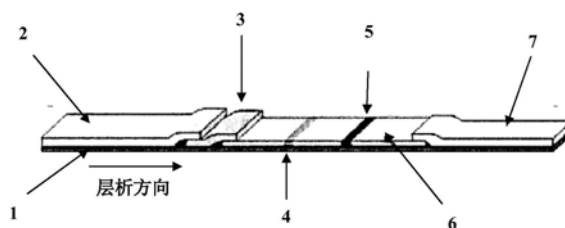
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

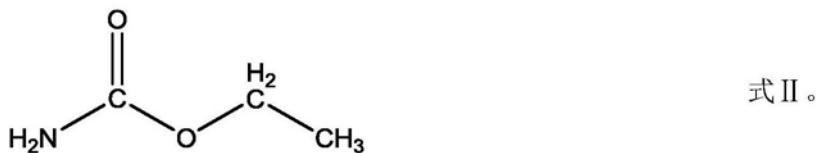
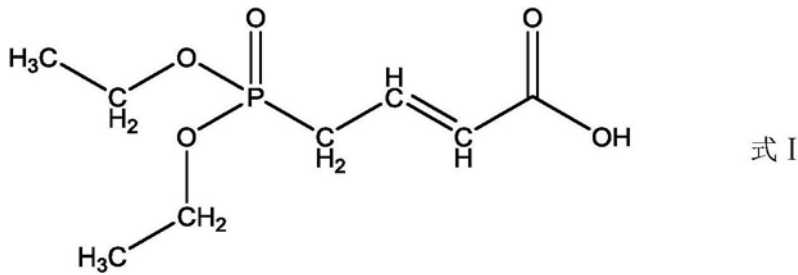
一种胶体金免疫层析试纸条及其制备和使用方法

(57)摘要

本发明公开了一种胶体金免疫层析试纸条及其制备和使用方法。该试纸条包括PVC底板、样品垫、金标垫、检测线、控制线、硝基纤维素膜、吸水垫；所述金标垫上包被有胶体金标记的有机磷农药通用抗体和氨基甲酸酯类通用抗体混合物；所述检测线包被有机磷农药通用半抗原与载体蛋白的偶联物，以及氨基甲酸酯类通用半抗原与载体蛋白的偶联物；所述控制线上包被兔抗鼠或羊抗鼠IgG抗体。该试纸条可对大部分有机磷农药和氨基甲酸酯类农药进行检测，灵敏度高，稳定性好，可用于蔬菜、水果等农产品中有机磷农药和氨基甲酸酯类农药残留的快速检测和初筛。



1. 一种胶体金免疫层析试纸条, 该试纸条包括PVC底板、样品垫、金标垫、检测线、控制线、硝基纤维素膜、吸水垫, 其特征在于: 所述样品垫、金标垫、检测线、控制线、硝基纤维素膜、吸水垫均设置在PVC底板的上方, 所述样品垫设置在PVC底板的边缘, 金标垫与样品垫部分重叠; 金标垫与吸水垫分别与硝基纤维素膜两端部分重叠; 硝基纤维素膜上靠近金标垫的一端喷涂有检测线, 靠近吸水垫的一端喷涂有控制线; 所述样品垫和金标垫为玻璃纤维膜, 金标垫上包被有胶体金标记的有机磷农药通用抗体和氨基甲酸酯类通用抗体混合物; 所述检测线包被有机磷农药通用半抗原与载体蛋白的偶联物, 以及氨基甲酸酯类通用半抗原与载体蛋白的偶联物; 所述控制线上包被兔抗鼠或羊抗鼠IgG抗体; 所述吸水垫为滤纸; 所述有机磷农药通用半抗原DEPB如式I所示, 所述氨基甲酸酯类通用半抗原EC如式II所示:



2. 一种如权利要求1所述的胶体金免疫层析试纸条的制备方法, 其特征在于包括以下步骤:

(1) 制备通用半抗原-载体蛋白偶联物: 将有机磷农药通用半抗原或氨基甲酸酯类通用半抗原与牛血清白蛋白或卵清白蛋白, 通过碳二亚胺法, 或活化酯法, 或混合酸酐法, 或重氮化法, 或戊二醛法等进行偶联, 制备通用半抗原-BSA偶联物与通用半抗原-OVA偶联物;

(2) 制备有机磷农药通用抗体和氨基甲酸酯类通用抗体: 将通用半抗原-BSA偶联物多次免疫小鼠, 取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞在体外进行融合, 制备杂交瘤细胞, 将阳性杂交瘤细胞注入小鼠腹腔收集腹水, 或以体外细胞培养的收集上清液的方式制备有机磷农药通用抗体和氨基甲酸酯类通用抗体;

(3) 制备胶体金: 以柠檬酸三钠还原法制备胶体金, 胶体金颗粒直径在20~25nm之间;

(4) 胶体金标记抗体: 将胶体金溶液与有机磷农药通用抗体和氨基甲酸酯类通用抗体按1μg/mL~20μg/mL的比例混匀, 通过离心纯化、浓缩, 制备成胶体金标记的有机磷农药通用抗体和氨基甲酸酯类通用抗体混合物;

(5) 将胶体金标记的有机磷农药通用抗体和氨基甲酸酯类通用抗体混合物喷涂并固定在金标垫上, 将DEPB-OVA偶联物和EC-OVA偶联物包被在检测线上, 将兔抗鼠IgG抗体或羊抗鼠IgG抗体包被在控制线上, 并充分干燥;

(6) 将硝基纤维素膜、金标垫、样品垫、吸水垫依次粘合在PVC底板上, 切成条状, 即制成检测有机磷和氨基甲酸酯类农药残留的胶体金免疫层析试纸条。

3. 一种如权利要求1所述的胶体金免疫层析试纸条的使用方法, 其特征在于:

样品经前处理后,用提取溶剂提取,得到样品溶液,将适量样品溶液滴加到样品垫上,样品溶液将会向右移动,待一段时间后,根据检测线和控制线的显色情况,判断样品中是否含有有机磷农药或氨基甲酸酯类农药,判断方法如下:

(1) 检测线显红色,控制线显红色——阴性结果,样品中不含有有机磷农药和氨基甲酸酯类农药;

(2) 检测线不显红色,控制线显红色——阳性结果,样品中含有有机磷农药或氨基甲酸酯类农药;

(3) 无论检测线显不显红色,控制线不显红色——试纸条失效。

4. 根据权利要求3所述的胶体金免疫层析试纸条的使用方法,其特征在于:所述提取溶剂为pH=7的磷酸缓冲盐溶液(PBS)缓冲液。

5. 根据权利要求3所述的胶体金免疫层析试纸条的使用方法,其特征在于:所述提取溶剂为含一定比例乙醇的pH=7的磷酸缓冲盐溶液(PBS)缓冲液。

一种胶体金免疫层析试纸条及其制备和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及对农药的检测领域,具体涉及一种胶体金免疫层析试纸条及其制备和使用方法。

背景技术

[0002] 有机磷农药和氨基甲酸酯类农药目前仍在广泛应用,其检出率高、超标量大、对人体的危害大。近年来,由于食用受到有机磷和氨基甲酸酯类农药污染的蔬菜导致急性中毒的事件屡有发生。因此,加大市场监管力度,开发农药残留快速检测技术,是关乎国计民生的大事。

[0003] 目前,农药残留快速检测技术主要有化学反应法、胆碱酯酶抑制法、发光菌检测法、化学发光技术、生物传感技术、生物芯片技术、免疫分析法等等。其中,利用免疫分析法进行农药残留分析,是一种新兴的农药检测方法。如在有机磷的检测中,将有机磷分子与蛋白质分子结合制成具有抗原性的物质来免疫动物产特异性的抗体,再与相应的抗原结合,发生抗原抗体免疫反应,具有选择性强,灵敏度高的优点。利用免疫分析法开发的酶联免疫试剂盒虽然具有简单、快速、灵敏度高、特异性强等优点,但抗体制备难度大,一般得到的一种抗体只适用于一种农药。

[0004] 利用宽谱特异性抗体进行有机磷农药多残留检测的研究已有报道,采用通用结构半抗原,与蛋白偶联后制备人工抗原,免疫动物后产生的抗体可同时对几种农药有特异性反应。宽谱特异性抗体的开发为有机磷农药多残留免疫分析提供了条件。但这些研究基本都处于研究阶段,市场上基本没有相应的农药多残留免疫检测产品。

[0005] 目前,市场上主要的农药检测产品主要采用酶抑制原理,如基于酶抑制比色法原理生产的农药残留速测仪、GB 5009.199-2003中采用的农药残留速测卡等等。但酶抑制法尚存在着批次间差异大、对温度敏感等问题。

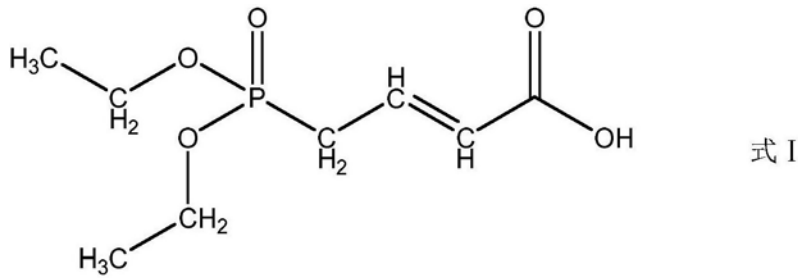
发明内容

[0006] 本发明的目的是针对以上现有技术存在的缺陷,提供一种可同时检测较多种有机磷农药和氨基甲酸酯类农药的胶体金免疫层析试纸条,可用于蔬菜、水果等农产品中有机磷农药和氨基甲酸酯类农药残留的快速检测和初筛。

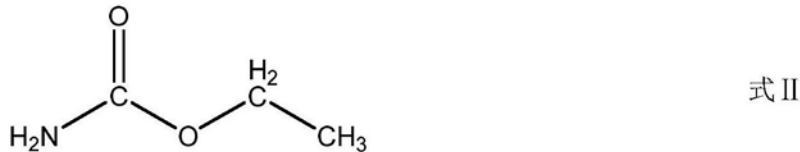
[0007] 为达到上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0008] 一种胶体金免疫层析试纸条,该试纸条包括PVC底板、样品垫、金标垫、检测线、控制线、硝基纤维素膜、吸水垫;所述样品垫、金标垫、检测线、控制线、硝基纤维素膜、吸水垫均设置在PVC底板的上方,所述样品垫设置在PVC底板的边缘,金标垫与样品垫部分重叠;金标垫与吸水垫分别与硝基纤维素膜两端部分重叠;硝基纤维素膜上靠近金标垫的一端喷涂有检测线,靠近吸水垫的一端喷涂有控制线;所述样品垫和金标垫为玻璃纤维膜,金标垫上包被有胶体金标记的有机磷农药通用抗体和氨基甲酸酯类通用抗体混合物;所述检测线包被有机磷农药通用半抗原与载体蛋白的偶联物,以及氨基甲酸酯类通用半抗原与载体蛋白

的偶联物；所述控制线上包被兔抗鼠或羊抗鼠 IgG 抗体；所述吸水垫为滤纸；所述有机磷农药通用半抗原 (DEPB) 如式 I 所示，所述氨基甲酸酯类通用半抗原 (EC) 如式 II 所示。



[0009]



[0010] 本发明所述检测有机磷和氨基甲酸酯类农药残留的胶体金免疫层析试纸条的制备方法，包括以下步骤：

[0011] 1. 制备通用半抗原-载体蛋白偶联物：将有机磷农药通用半抗原或 EC 与牛血清白蛋白 (BSA) 或卵清白蛋白 (OVA)，通过碳二亚胺法，或活化酯法，或混合酸酐法，或重氮化法，或戊二醛法等进行偶联，制备通用半抗原-BSA 偶联物与通用半抗原-OVA 偶联物；

[0012] 2. 制备有机磷农药通用抗体和氨基甲酸酯类通用抗体：将通用半抗原-BSA 偶联物多次免疫小鼠，取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞在体外进行融合，制备杂交瘤细胞。将阳性杂交瘤细胞注入小鼠腹腔收集腹水，或以体外细胞培养的收集上清液的方式制备有机磷农药通用抗体和氨基甲酸酯类通用抗体；

[0013] 3. 制备胶体金：以柠檬酸三钠还原法制备胶体金，胶体金颗粒直径在 20~25nm 之间；

[0014] 4. 胶体金标记抗体：将胶体金溶液与有机磷农药通用抗体和氨基甲酸酯类通用抗体按 1μg/mL~20μg/mL 的比例混匀，通过离心纯化、浓缩，制备成胶体金标记的有机磷农药通用抗体和氨基甲酸酯类通用抗体混合物；

[0015] 5. 将胶体金标记的有机磷农药通用抗体和氨基甲酸酯类通用抗体混合物喷涂并固定在金标垫上，将 DEPB-OVA 偶联物和 EC-OVA 偶联物包被在检测线上 (包被抗原)，将兔抗鼠 IgG 抗体或羊抗鼠 IgG 抗体包被在控制线上，并充分干燥；

[0016] 6. 将硝基纤维素膜、金标垫、样品垫、吸水垫依次粘合在 PVC 底板上，切成条状，即制成检测有机磷和氨基甲酸酯类农药残留的胶体金免疫层析试纸条。

[0017] 本发明所述的检测有机磷和氨基甲酸酯类农药残留的胶体金免疫层析试纸条的使用方法如下：

[0018] 样品经前处理后，用提取溶剂提取 (提取溶剂为 pH=7 的 PBS 缓冲液，或含一定比例乙醇的 pH=7 的 PBS 缓冲液，得到样品溶液。将适量样品溶液滴加到样品垫上，样品溶液将会向右移动。待一段时间后，根据检测线和控制线的显色情况，判断样品中是否含有有机磷农药或氨基甲酸酯类农药，判断方法如下：

[0019] (1) 检测线显红色，控制线显红色——阴性结果，样品中不含有有机磷农药和氨基甲

酸酯类农药；

[0020] (2) 检测线不显红色,控制线显红色——阳性结果,样品中含有有机磷农药或氨基甲酸酯类农药；

[0021] (3) 无论检测线显不显红色,控制线不显红色——试纸条失效。

[0022] 本发明的有机磷和氨基甲酸酯类农药残留的胶体金免疫层析试纸条检测有机磷和氨基甲酸酯类农药的原理如下：

[0023] 滴加待测样品后,样品溶液在各种膜的毛细作用下,沿着样品垫向右移动,移动到金标垫时,样品溶液溶解胶体金标记的抗体。当样品中含有待测物时,将于胶体金标记的抗体结合并一起向右移动,到达固定有包被抗原的检测线时,包被抗原将和待测物竞争结合胶体金标记抗体,样品中待测物含量越高,竞争越明显,检测线上的包被抗原与胶体金标记抗体结合越少。当包被抗原所结合的胶体金标记抗体少于一定数量时,检测线将不显红色。无论样品中含不含有待测物,过量的胶体金标记抗体或其与待测物结合物都会与控制线的兔抗鼠IgG抗体或羊抗鼠IgG抗体结合,形成一条红色线。若控制线不显红色,则说明试纸条失效,需要重新更换试纸条进行检测。

[0024] 本发明的有机磷和氨基甲酸酯类农药残留的胶体金免疫层析试纸条具有以下优势：

[0025] (1) 本发明首次采用检测范围更宽的有机磷农药通用半抗原DEPB,其具有与大部分有机磷农药相似的通用结构,制成的有机磷农药通用抗体可对大部分有机磷农药进行特异性识别,检测范围宽,灵敏度高；

[0026] (2) 本发明首次采用氨基甲酸酯类农药通用半抗原EC制备通用抗体,提高了与多种氨基甲酸酯类农药抗原分子的特异性；

[0027] (3) 本发明首次将有机磷农药通用抗体与氨基甲酸酯类农药通用抗体一起包被于金标垫上,且将有机磷农药通用半抗原-OVA偶联物和氨基甲酸酯类农药通用半抗原-OVA偶联物共同包被于检测线,可同时对有机磷农药和氨基甲酸酯类农药进行检测,大大提高了检测效率。

附图说明

[0028] 图1为本发明胶体金免疫层析试纸条的结构示意图。

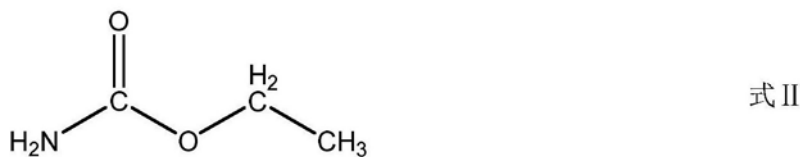
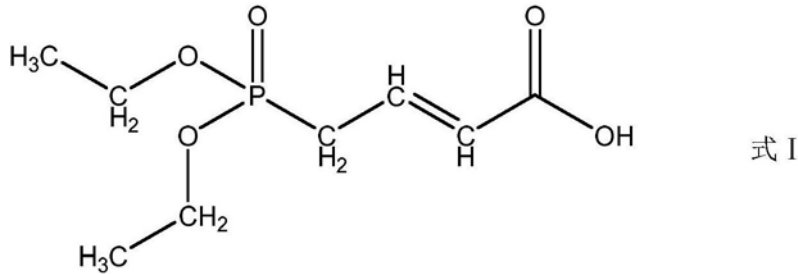
具体实施方式

[0029] 以下结合具体实施例进一步详细描述本发明的技术方案。

[0030] 在本发明中,DMSO为二甲基亚砜,NHS为N-羟基琥珀酰亚胺,EDC为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,DEPB为有机磷农药通用半抗原;EC为氨基甲酸酯类通用半抗原,PBS为磷酸缓冲盐溶液;BSA为牛血清白蛋白。

[0031] 如图1所示:一种胶体金免疫层析试纸条,该试纸条包括PVC底板1、样品垫2、金标垫3、检测线4、控制线5、硝基纤维素膜6、吸水垫7;所述样品垫2、金标垫3、检测线4、控制线5、硝基纤维素膜6、吸水垫7均设置在PVC底板1的上方,所述样品垫2设置在PVC底板1的边缘,金标垫3与样品垫2部分重叠;金标垫3与吸水垫7分别与硝基纤维素膜6两端部分重叠;硝基纤维素膜6上靠近金标垫3的一端喷涂有检测线4,靠近吸水垫7的一端喷涂有控制线5;

所述样品垫2和金标垫3为玻璃纤维膜,金标垫3上包被有胶体金标记的有机磷农药通用抗体和氨基甲酸酯类通用抗体混合物;所述检测线4包被有机磷农药通用半抗原与载体蛋白的偶联物,以及氨基甲酸酯类通用半抗原与载体蛋白的偶联物;所述控制线5上包被兔抗鼠或羊抗鼠 IgG 抗体;所述吸水垫7为滤纸;所述有机磷农药通用半抗原 (DEPB) 如式 I 所示,所述氨基甲酸酯类通用半抗原 (EC) 如式 II 所示。



[0033] 本发明的具体实施例如下:

[0034] 实施例1:通用半抗原-载体蛋白偶联物的制备;

[0035] 以DEPB-BSA偶联物的制备为例:本发明所采用的有机磷通用半抗原中含有羧基基团,采用碳二亚胺法,使羧基与载体蛋白中的氨基结合反应,将有机磷通用半抗原与载体蛋白偶联。具体操作如下:称取0.0667g DEPB,0.0345g NHS和0.0575g EDC,溶于3mL二甲基亚砜(DMSO)中,磁力搅拌过夜。称取0.12g牛血清白蛋白(BSA),溶解在5mL碳酸氢钠缓冲液中(0.1mol/L,pH7.0),得到BSA溶液。在搅拌下,将EDC溶液缓慢滴加到BSA溶液中,反应过夜,所得溶液用蒸馏水与4℃透析5天,每天每隔8h换一次透析液。最后将溶液-20℃冷冻干燥,即得DEPB-BSA偶联物。

[0036] 实施例2:应用实施例;

[0037] 在市场上取蔬菜叶片,剪取适量,磨碎,加入含5%乙醇的pH=7的PBS缓冲溶液振荡提取,放置分层。吸取上清液,滴加到有机磷和氨基甲酸酯类农药残留的胶体金免疫层析试纸条样品垫上,反应5~10min,观察检测线和控制线显色情况。若检测线和控制线均显红色,则结果为阴性,表明样品中不含有有机磷农药和氨基甲酸酯类农药;若检测线不显红色,控制线显红色,则结果为阳性,表明样品中含有有机磷农药或氨基甲酸酯类农药;若控制线不显红色,说明试纸条失效,需使用新的试纸条进行检测。

[0038] 实施例3:灵敏度测试;

[0039] 用本发明的试纸条对25种有机磷农药和10种氨基甲酸酯类农药进行检测,每种农药均配制成不同的浓度。结果显示,杀螟威、甲基对氧磷、苯线磷、杀虫畏、马拉硫磷、二嗪磷、敌瘟磷、乙基嘧啶磷、速灭磷、杀螟硫磷、久效磷、甲基对硫磷、甲基毒死蜱、毒死蜱、甲胺磷、甲拌磷、乐果、氧乐果、乙酰甲胺磷、百治磷、对硫磷、内吸磷、敌敌畏、特丁硫磷、胺丙畏等25种有机磷农药检测结果均为阳性,最低检测限在0.1mg/kg~1mg/kg之间。10种氨基甲酸酯类农药中,抗蚜威、克百威、涕灭威、灭多威、甲萘威、速灭威、残杀威、异丙威、丁硫克百

威、混杀威10种检测结果均为阳性,最低检测限在0.2mg/kg~3mg/kg之间。说明本发明的试纸条可对大多数有机磷农药和氨基甲酸酯类农药进行检测。

[0040] 实施例4:特异性测试;

[0041] 用本发明的试纸条对5种有机氯农药以及5种二硫代氨基甲酸酯类农药进行检测,结果显示,滴滴涕、六六六、硫丹、敌稗和氯丹等5种有机氯农药、福美双、丙森锌、代森锌、代森联和代森锰锌等5种二硫代氨基甲酸酯类农药检测结果为阳性。说明本发明的试纸条可对有机磷农药和氨基甲酸酯类农药进行特异性检测,而对有机氯农药和二硫代氨基甲酸酯类农药无特异性反应。

[0042] 实施例5:稳定性测试;

[0043] 将用本发明方法制作好的试纸条装入密封袋内,内置干燥剂,置于45℃烘箱内保存,分别于7天、14天、21天、28天、35天、42天取出,检测试纸条的稳定性。结果显示,45℃保存7天、14天、21天、28天、35天,检测结果均无明显变化,45℃保存42天,金标垫上胶体金标记的抗体的复溶效果明显下降,检测线和控制线的颜色明显变浅,灵敏度下降。45℃保存42天,相当于常温保存15个月。

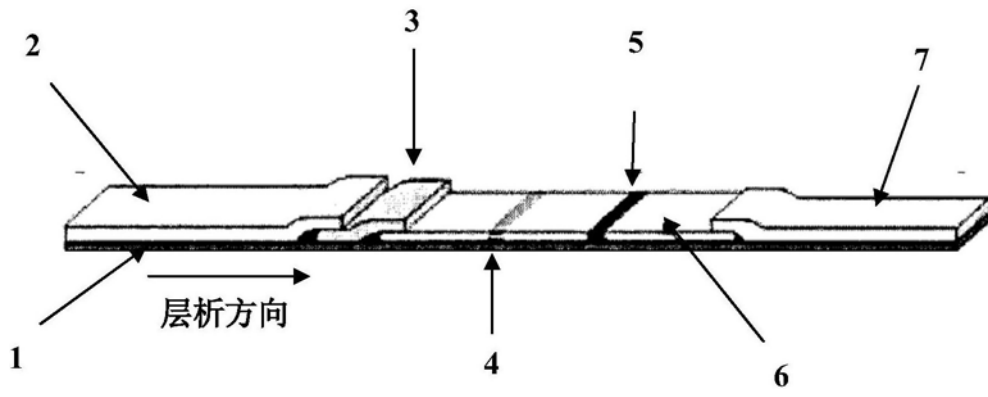


图1

专利名称(译)	一种胶体金免疫层析试纸条及其制备和使用方法		
公开(公告)号	CN106324243B	公开(公告)日	2018-07-13
申请号	CN201610711306.7	申请日	2016-08-23
[标]申请(专利权)人(译)	广东志道医药科技有限公司 广州安诺食品科学技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	广东志道医药科技有限公司 广州安诺食品科学技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广东志道医药科技有限公司 广州安诺食品科学技术有限公司		
[标]发明人	冯锐 龙飞 杨鹏博 杨松林 罗莉妮		
发明人	冯锐 龙飞 杨鹏博 杨松林 罗莉妮		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54306 G01N33/558		
其他公开文献	CN106324243A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种胶体金免疫层析试纸条及其制备和使用方法。该试纸条包括PVC底板、样品垫、金标垫、检测线、控制线、硝基纤维素膜、吸水垫；所述金标垫上包被有胶体金标记的有机磷农药通用抗体和氨基甲酸酯类通用抗体混合物；所述检测线包被有机磷农药通用半抗原与载体蛋白的偶联物，以及氨基甲酸酯类通用半抗原与载体蛋白的偶联物；所述控制线上包被兔抗鼠或羊抗鼠IgG抗体。该试纸条可对大部分有机磷农药和氨基甲酸酯类农药进行检测，灵敏度高，稳定性好，可用于蔬菜、水果等农产品中有机磷农药和氨基甲酸酯类农药残留的快速检测和初筛。

