



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106749671 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611267701.7

(22)申请日 2016.12.31

(71)申请人 沈阳金诚科技有限公司

地址 110161 辽宁省沈阳市东陵区东陵路
185号

(72)发明人 马列 纪明山 魏松红 闫恕
姜震

(74)专利代理机构 沈阳科威专利代理有限责任
公司 21101

代理人 张述学

(51)Int.Cl.

G07K 16/44(2006.01)

G07K 16/06(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种检测吡虫啉残留的ELISA检测试剂盒及
检测方法

(57)摘要

本发明提供一种检测吡虫啉残留的ELISA检测试剂盒及检测方法,试剂盒包被有吡虫啉包被原的酶标板、吡虫啉抗体、吡虫啉标准品;辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体;洗涤液、底物液、反应终止液。利用该试剂盒检测果蔬中吡虫啉残留,具有高特异性、高灵敏度、价格低廉、操作简单的特点,实现大批量快速检测果蔬吡虫啉残留。

1. 一种吡虫啉多克隆抗体制备方法,其特征在于步骤如下:

(1) 称取吡虫啉于三口烧瓶中,用DMSO 溶解,再加入KOH ;另称取 β -巯基丙酸,用DMSO 溶解并转移至恒压滴液漏斗中;在搅拌下将 β -巯基丙酸溶液缓慢滴加到三口烧瓶中,于油浴上使之缓慢升温至100℃,保温2 h后,撤去油浴;待产物自然冷却至室温后,加入水,以HCl溶液调节pH 值为3;将此混合液转移到分液漏斗中,用二氯甲烷分3次提取,收集有机相;用NaHCO₃水溶液分3 次洗涤二氯甲烷提取液,收集水相;用乙醚洗涤水相,弃去乙醚层;再用HCl溶液调节水相pH 值为3,然后用乙酸乙酯分3 次萃取水相,合并乙酸乙酯提取液;用蒸馏水洗涤乙酸乙酯,弃水层;提取液经无水硫酸钠干燥后,减压浓缩,得到黄色粘稠液体;加入丙酮溶液溶解,静置过夜,有黄色晶体析出;过滤,取出晶体,供MS 和¹H-NMR 鉴定结构,即得到吡虫啉的半抗原;

(2) 将半抗原溶解在N,N-二甲基甲酰胺中,然后加二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,让其在室温下搅拌反应过夜,反应液经离心后,吸取上清液缓慢滴加到牛血清蛋白碳酸盐缓冲溶液,搅拌反应6 h;待反应完成后,装入透析袋进行透析,透析结束后取出分装保存于-20℃的冰箱中,即得到吡虫啉的人工完全抗原;

(3) 利用吡虫啉人工抗原对小型哺乳动物进行免疫,所得到的多克隆抗体即为吡虫啉多克隆抗体。

2. 一种检测吡虫啉残留的ELISA检测试剂盒,其特征在于包括有:

包被有吡虫啉包被原的酶标板;

吡虫啉抗体;

吡虫啉标准品;

辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体;

洗涤液Na₂HPO₄ · 12H₂O 68.8 g, NaH₂PO₄ 6.9 g, NaCl 45 g;

底物液: 底物液A: 无水乙酸钠8.2 g, β -糊精2.5 g, 过氧化氢脲428.6 mg, 加双蒸水至1000 mL, 调节PH至5.0, 4℃保存; 底物液B: 取100 mg TMB溶于10 mL DMSO中, 棕色瓶保存。

3. 使用前取14.6 mL底物液A和0.45 mL底物液B混合15 min;

反应终止液为1.25 mol/L的H₂SO₄。

4. 根据权利要求2所述的检测吡虫啉残留的ELISA检测试剂盒,其特征在于所述吡虫啉偶联抗原是由吡虫啉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、鸡卵清蛋白。

5. 一种利用如权利要求2或3所述的试剂盒检测果蔬中吡虫啉残留的方法,其特征在于主要步骤如下:

(1) 称取果蔬中可食用部分,加入提取液,充分研磨并过滤,所得滤液即为待测样品;

(2) 在包被有吡虫啉抗原并封闭好的酶标板孔中,加入相同体积的吡虫啉抗体及待测样品,37 °C孵育40 min后用洗涤液,静置5min,甩掉洗液,将酶标板拍干,洗涤3次;

(3) 加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体0.1 mL,37 °C孵育40min后用洗涤液,静置5min,甩掉洗液,将酶标板拍干,洗涤3次;

(4) 加入新鲜配制的底物液,每孔0.1 mL,37 °C反应30min,观察颜色变化;

(5) 待显色反应结束后,加入终止液,每孔0.05 mL,终止反应;

(6) 将酶标板置于酶标仪中,于490 nm波长处测定检测结果。

一种检测吡虫啉残留的ELISA检测试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于蔬菜水果农药残留检测技术,具体涉及一种用于吡虫啉残留分析的ELISA检测试剂盒及检测方法。

技术背景

[0002] 吡虫啉(imidacloprid),化学名称1-(6-氯-3-吡啶基甲基)-N-硝基亚咪唑烷-2-基胺。吡虫啉是烟碱类超高效杀虫剂,具有广谱、高效、低毒、低残留,害虫不易产生抗性,对人、畜、植物和天敌安全等特点,并有触杀、胃毒和内吸等多重作用。对飞虱、蚜虫、叶蝉等刺吸式口器害虫有特效。

[0003] 目前检测吡虫啉的技术手段主要有气相色谱-串联质谱、液相色谱-串联质谱法等,但这些方法都存在回收率低、检测样品前处理程序繁琐等缺点,不适用于大量样品的检测工作。因此,迫切需要一种方便快捷的新型检测方法对果蔬中吡虫啉的残留进行检测。酶联免疫吸附法是一种准确、可靠、快速、特异的检测方法,适合于大批样品的快速筛选,近年来已广泛应用于食品安全检测行业。本发明旨在建立一种检测吡虫啉的酶联免疫试剂盒及其检测方法。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是针对现有技术的不足,提供一种检测吡虫啉的酶联免疫试剂盒及高特异性、高灵敏度、价格低廉、操作简单,能大批量快速检测吡虫啉的酶联免疫检测方法。

[0005] 本发明提供一种吡虫啉的人工抗体的制备方法,步骤如下:

(1)称取吡虫啉于三口烧瓶中,用DMSO溶解,再加入KOH;另称取β-巯基丙酸,用DMSO溶解并转移至恒压滴液漏斗中;在搅拌下将β-巯基丙酸溶液缓慢滴加到三口烧瓶中,于油浴上使之缓慢升温至100℃,保温2 h后,撤去油浴;待产物自然冷却至室温后,加入水,以HCl溶液调节pH值为3;将此混合液转移到分液漏斗中,用二氯甲烷分3次提取,收集有机相;用NaHCO₃水溶液分3次洗涤二氯甲烷提取液,收集水相;用乙醚洗涤水相,弃去乙醚层;再用HCl溶液调节水相pH值为3,然后用乙酸乙酯分3次萃取水相,合并乙酸乙酯提取液;用蒸馏水洗涤乙酸乙酯,弃水层;提取液经无水硫酸钠干燥后,减压浓缩,得到黄色粘稠液体;加入丙酮溶液溶解,静置过夜,有黄色晶体析出;过滤,取出晶体,供MS和¹H-NMR鉴定结构,即得到吡虫啉的半抗原;

(2)将半抗原溶解在N,N-二甲基甲酰胺中,然后加二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,让其在室温下搅拌反应过夜,反应液经离心后,吸取上清液缓慢滴加到牛血清蛋白碳酸盐缓冲溶液,搅拌反应6 h;待反应完成后,装入透析袋进行透析,透析结束后取出分装保存于-20℃的冰箱中,即得到吡虫啉的人工完全抗原;

(3)利用吡虫啉人工抗原对小型哺乳动物进行免疫,所得到的多克隆抗体即为吡虫啉多克隆抗体。

[0006] 本发明提供一种检测吡虫啉残留的ELISA检测试剂盒,其特征在于包括有:

包被有吡虫啉包被原的酶标板;

吡虫啉抗体;

吡虫啉标准品;

辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体;

洗涤液 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 68.8 g, NaH_2PO_4 6.9 g, NaCl 45 g;

底物液: 底物液A: 无水乙酸钠8.2 g, β -糊精2.5 g, 过氧化氢脲428.6 mg, 加双蒸水至1000 mL, 调节PH至5.0, 4℃保存; 底物液B: 取100 mg TMB溶于10 mL DMSO中, 棕色瓶保存。使用前取14.6 mL底物液A和0.45 mL底物液B混合15 min;

反应终止液为1.25 mol/L的 H_2SO_4 。

[0007] 上述的吡虫啉偶联抗原是由吡虫啉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、鸡卵清蛋白。

[0008] 本发明提供的测果蔬中吡虫啉残留的ELISA试剂盒检测方法, 其主要步骤如下:

(1) 称取果蔬中可食用部分, 加入提取液, 充分研磨并过滤, 所得滤液即为待测样品;

(2) 在包被有吡虫啉抗原并封闭好的酶标板孔中, 加入相同体积的吡虫啉抗体及待测样品, 37℃孵育40 min后用洗涤液, 静置5min, 甩掉洗液, 将酶标板拍干, 洗涤3次;

(3) 加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体0.1 mL, 37℃孵育40min后用洗涤液, 静置5min, 甩掉洗液, 将酶标板拍干, 洗涤3次;

(4) 加入新鲜配制的底物液, 每孔0.1 mL, 37℃反应30min, 观察颜色变化;

(5) 待显色反应结束后, 加入终止液, 每孔0.05 mL, 终止反应;

(6) 将酶标板置于酶标仪中, 于490 nm波长处测定检测结果。

[0009] 本发明的积极效果: 本发明提供了检测吡虫啉的酶联免疫试剂盒, 利用该试剂盒检测果蔬中吡虫啉残留, 具有高特异性、高灵敏度、价格低廉、操作简单等特点, 实现大批量快速检测果蔬吡虫啉残留。

具体实施方式

[0010] 实施例1

吡虫啉人工抗原制备

(1) 称取20 mmol吡虫啉5.15g于100 mL三口烧瓶中, 用20 mL DMSO溶解, 再加入40mmol KOH 2.25 g; 另称取20mmol β -巯基丙酸2.10 g, 用10 mL DMSO溶解并转移至50 mL恒压滴液漏斗中; 在搅拌下将 β -巯基丙酸溶液缓慢滴加到三口烧瓶中, 于油浴上使之缓慢升温至100℃, 保温2 h后, 撤去油浴;

待产物自然冷却至室温后, 加入50mL水, 以6 mol/L HCl溶液调节pH值为3; 将此混合液转移到250 mL分液漏斗中, 用90 mL二氯甲烷分3次提取, 收集有机相; 用75 mL 1 mol/L NaHCO_3 水溶液分3次洗涤二氯甲烷提取液, 收集水相; 用乙醚洗涤水相, 弃去乙醚层; 再用6 mol/L HCl溶液调节水相pH值为3, 然后用90 mL乙酸乙酯分3次萃取水相, 合并乙酸乙酯提取液; 用蒸馏水洗涤乙酸乙酯, 弃水层; 提取液经无水硫酸钠干燥后, 减压浓缩, 得到黄色粘稠液体; 加入少量丙酮溶液溶解, 静置过夜, 有黄色晶体析出; 过滤, 取出晶体, 供MS和 $^1\text{H-NMR}$ 鉴定结构, 即得到吡虫啉的半抗原。

[0011] (2)将50~80 μmol 半抗原溶解在2ml N,N-二甲基甲酰胺中,然后加入1ml二环己基碳二亚胺和1ml N-羟基琥珀酰亚胺,让其在室温下搅拌反应过夜,反应液经离心(4000r/min)后,吸取上清液800 μl 缓慢滴加到8 ml 20 mg/ml 牛血清蛋白(BSA)碳酸盐缓冲溶液(0.05 mol/L,pH 9.0),搅拌反应6 h。待反应完成后,装入透析袋,先用蒸馏水透析3次,然后用PBS透析3 d,取出分装保存于-20℃的冰箱中,即得到吡虫啉的人工完全抗原。

[0012] 实施例2

吡虫啉多克隆抗体制备

取3mg吡虫啉人工抗原溶于1ml生理盐水中,将稀释过的吡虫啉人工抗原与等体积的弗式完全佐剂进行乳化,随后利用皮下多点注射的方法将乳化后的人工抗原注射于新西兰大白兔体内,每只大白兔一次用量为0.5mg/kg,15天后,将同样用生理盐水稀释过的吡虫啉人工抗原与等体积的弗式不完全佐剂进行乳化,加强免疫,用量为0.01mg/kg;15天后,进行第三次使用稀释过的吡虫啉人工抗原与等体积的弗式不完全佐剂进行乳化后,进行加强免疫;从此次加强免疫开始,免疫7天后取血,并测定其抗血清效价;将制备好的吡虫啉多克隆抗体保存于-20℃备用。

[0013] 实施例3

吡虫啉残留的ELISA检测试剂盒,包括有:

包被有吡虫啉包被原的酶标板。

[0014] 吡虫啉抗体。

[0015] 吡虫啉标准品。

[0016] 辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体。

[0017] 洗涤液 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 68.8 g, NaH_2PO_4 6.9 g, NaCl 45 g。

[0018] 底物液:底物液A:无水乙酸钠8.2 g, β -糊精2.5 g,过氧化氢脲428.6 mg,加双蒸水至1000 mL,调节PH至5.0,4℃保存;底物液B:取100 mg TMB溶于10 mL DMSO中,棕色瓶保存。使用前取14.6 mL底物液A和0.45 mL底物液B混合15 min。

[0019] 反应终止液为1.25 mol/L的 H_2SO_4 。

[0020] 说明书1份。

[0021] 实施例4

利用试剂盒检测果蔬中吡虫啉残留

(1)样品前处理:称取果蔬中可食用部分10 g放入研钵中,加入取10 mL提取液,充分研磨并过滤,所得滤液即为待测样品。

[0022] (2)在包被有吡虫啉抗原并封闭好的酶标板孔中,加入相同体积的吡虫啉抗体及待测样品,37℃孵育40 min后用洗涤液,静置5min,甩掉洗液,将酶标板拍干,洗涤3次。

[0023] (3)加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体0.1 mL,37℃孵育40min后用洗涤液,静置5min,甩掉洗液,将酶标板拍干,洗涤3次。

[0024] (4)加入新鲜配制的底酶标板物显色液,每孔0.1 mL,37℃反应30min,观察颜色变化。

[0025] (5)待显色反应结束后,加入终止液,每孔0.05 mL,终止反应。

[0026] (6)将酶标板置于酶标仪中,于490 nm波长处测定检测结果。

专利名称(译)	一种检测吡虫啉残留的ELISA检测试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	CN106749671A	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201611267701.7	申请日	2016-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	沈阳金诚科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	沈阳金诚科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	沈阳金诚科技有限公司		
[标]发明人	马列 纪明山 魏松红 闫恕 姜震		
发明人	马列 纪明山 魏松红 闫恕 姜震		
IPC分类号	C07K16/44 C07K16/06 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/44 C07K16/06 G01N33/5308 G01N2430/10		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测吡虫啉残留的ELISA检测试剂盒及检测方法，试剂盒包被有吡虫啉包被原的酶标板、吡虫啉抗体、吡虫啉标准品；辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体；洗涤液、底物液、反应终止液。利用该试剂盒检测果蔬中吡虫啉残留，具有高特异性、高灵敏度、价格低廉、操作简单的特点，实现大批量快速检测果蔬吡虫啉残留。