



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109752369 A

(43)申请公布日 2019.05.14

(21)申请号 201711059643.3

(22)申请日 2017.11.02

(71)申请人 镇江亿特生物科技发展有限公司  
地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯经十  
二路668号

(72)发明人 洪霞 杜霞 立雯馨

(51)Int.Cl.

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种检测茶叶中氟虫腈的化学发光免疫检测试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种检测氟虫腈的化学发光免疫检测试剂盒,属于免疫学检测领域。本发明的试剂盒由包被有氟虫腈-载体蛋白偶联物的不透明白色酶标板、氟虫腈标准品、氟虫腈-过氧化物酶标记抗体工作液、发光底物液、浓缩样品稀释液、浓缩洗涤液组成。所述氟虫腈-载体蛋白偶联物是将氟虫腈与载体蛋白通过混合酸酐法或碳二亚胺法偶联得到,浓缩洗涤液含有0.05%吐温-20。与传统的酶联免疫吸附分析法比较,本发明的试剂盒具有更高的灵敏度,且检测时间短、费用低,可用于茶叶样品中氟虫腈的残留量检测。

1. 一种检测氟虫腓的化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于试剂盒中的以下成份:

(1) 包被有氟虫腓-载体蛋白偶联物的不透明白色酶标板;所述氟虫腓-载体蛋白偶联物是将氟虫腓与载体蛋白通过混合酸酐法或碳二亚胺法偶联得到,所述载体蛋白为人血清白蛋白、牛血清白蛋白、鸡蛋白蛋白、鼠血清蛋白或兔血清蛋白;

(2) 氟虫腓标准品;

(3) 氟虫腓-过氧化物酶标记抗体:该成分为用过氧化物酶标记的氟虫腓抗体,所述氟虫腓抗体为单克隆抗体;

(4) 发光底物液:该发光底物液是以鲁米诺货异鲁米诺为发光剂的化学发光底物液,分为A液和B液保存,在使用前按1:1混合使用;其中A液为发光增强剂加鲁米诺货发光增强剂加异鲁米诺,B液为过氧化氢溶液或尿素过氧化氢溶液;

(5) 2倍浓缩稀释液;

(6) 20倍浓缩洗涤液。

2. 根据权利要求1的氟虫腓的化学发光免疫检测试剂盒,其中,所述不透明白色酶标板为96孔的可拆卸或不可拆卸的不透明白色酶标板。

3. 根据权利要求1的氟虫腓的化学发光免疫检测试剂盒,其中,所述氟虫腓标准品的浓度为0.02~5.12 ng/mL的浓度区间。

4. 根据权利要求1的氟虫腓的化学发光免疫检测试剂盒,其中,所述氟虫腓-过氧化物酶标记抗体工作液是用抗体稀释液稀释成1:20000比例。

5. 根据权利要求1的氟虫腓的化学发光免疫检测试剂盒,其中,所述发光底物液为商品化的任一种以鲁米诺货异鲁米诺为发光剂的化学发光底物液。

6. 根据权利要求1的氟虫腓的化学发光免疫检测试剂盒,其中,所述2倍浓缩稀释液,其成分为0.01mol/L,pH7.4的磷酸缓冲液、甘氨酸-HCl缓冲液或Tris-HCl缓冲液,使用前请按1:1稀释(1份浓缩样品稀释液+1份去离子水)。

7. 根据权利要求1的氟虫腓的化学发光免疫检测试剂盒,其中,所述20倍浓缩洗涤液,其包含0.05%吐温-20,0.01mol/L的PBST,pH值范围7.0-7.5之间,使用前请按1:19稀释(1份浓缩稀释液+19份去离子水)。

## 一种检测茶叶中氟虫腈的化学发光免疫检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测氟虫腈的化学发光免疫检测试剂盒,用于检测动物源性食品中如茶叶中的氟虫腈含量或残留量。属于免疫学检测领域。

### 背景技术

[0002] 氟虫腈英文通用名为Fipronil(氟虫腈),商品名Regent(锐劲特),是一种苯基吡唑类广谱杀虫剂,可杀灭跳蚤、螨、虱、蚜虫、叶蝉、蝇类和鞘翅目等害虫。主要用于防治蔬菜、水稻、烟草、棉花、畜牧业、公共卫生、贮存用品及地面中各类别的作物害虫以及卫生害虫。

[0003] 由于氟虫腈对蜜蜂、水生生物毒性很大,对环境不友好,很多国家都禁止该药物的使用。世界卫生组织(WHO)称持续时间大量进食高浓度氟虫腈会损害肝脏、甲状腺和肾脏,它被列为“对人类有中度毒性”的化学品。对整个欧洲的蛋鸡养殖产业形成严重打击,“毒鸡蛋”风波据估计已造成相关行业上亿欧元的经济损失。

[0004] 农业部第1157号公告:“自2009年10月1日起,除卫生用、玉米等部分旱田种子包衣剂外,在我国境内停止销售和使用用于其他方面的含氟虫腈成分的农药制剂。农业部第2583号公告:禁止非泼罗尼及相关制剂(即氟虫腈)用于食品动物。农业部近日连发两个通知,要求切实加强农药使用指导和市场监管,加强蛋禽养殖质量安全管理,严禁将氟虫腈作为兽药经营和使用,重点针对氟虫腈违法违规使用问题开展大检查,严防其在生产经营各环节对饲料原料和产品造成污染。GB2763-2016中明确了氟虫腈在谷物、油料和油脂、蔬菜、水果、糖类和食用菌中的限量。玉米及鲜食玉米为0.1mg/kg,其他为0.02mg/kg。2017年5月5日,台中市抽验休闲小站一款“红茶”检出氟虫腈0.003ppm,超过标准的0.002ppm。世界卫生组织(WHO)指,大量进食高浓度氟虫腈一段时间,会损害肝脏、甲状腺和肾脏。

[0005] 由于氟虫腈具有毒性大,致癌性强等特点。这就要求检测方法灵敏度高,特异性强,集分离与检测为一体,目前氟虫腈的测定方法主要为高效液相色谱法(HPLC)。

[0006] 化学发光免疫检测技术是化学发光法和免疫分析法结合的产物,因此同时具有化学发光检测技术的高灵敏性和免疫分析技术的高特异性。本发明通过特有的免疫动物制备具有高亲和力、高特异性的氟虫腈抗体,并采用酶标记抗体,建立一种可以检测氟虫腈的化学发光免疫试剂盒,将为茶叶产品中氟虫腈药物残留检测提供新方法,对保证畜产品安全提供重要的理论和实践依据,维护畜牧业健康发展具有重要意义。

### 发明内容

[0007] 针对现有技术中存在的问题,本发明主要是利用抗原与抗体的特异性免疫反应的基本原理来实现的。化学发光免疫分析是化学发光法和免疫分析法结合的产物,因此同时具有化学发光法的高灵敏度和免疫分析法的高特异性。在整个反应过程中,样品中氟虫腈含量越高,反应体系中发光强度越弱;反之,样品中氟虫腈含量越少,发光强度越高。

[0008] 本发明是一种检测氟虫腈的化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于含有以下成

份：

1、包被有氟虫腓-载体蛋白偶联物的不透明白色酶标板；所述氟虫腓-载体蛋白偶联物是将氟虫腓与载体蛋白通过混合酸酐法或碳二亚胺法偶联得到，所述载体蛋白为人血清白蛋白、牛血清白蛋白、鸡蛋白蛋白、鼠血清蛋白或兔血清蛋白；

2、氟虫腓标准品；

3、氟虫腓-过氧化物酶标记抗体：该成分为用过氧化物酶标记的氟虫腓抗体，所述氟虫腓抗体为单克隆抗体或多克隆抗体；

4、发光底物液：该发光底物液是以鲁米诺衍生物为发光剂的化学发光底物液，分为A液和B液保存，在使用前按1:1混合使用；其中A液位发光增强剂加鲁米诺衍生物发光增强剂加异鲁米诺，B液为过氧化氢溶液或尿素过氧化氢溶液；

5、2倍浓缩稀释液；

6、20倍浓缩洗涤液；

本发明中，所述的不透明白色酶标板为96孔的可拆卸或不可拆卸的不透明白色酶标板。

[0009] 本发明中，所述的氟虫腓标准品，由一系列不同浓度的氟虫腓标准品组成，浓度为0.02~5.12 ng/mL的浓度区间。

[0010] 本发明中，所述的氟虫腓-过氧化物酶标记抗体为用过氧化物酶标记的氟虫腓抗体，如辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的氟虫腓抗体。

[0011] 本发明中，所述的发光底物液为商品化的任一种以鲁米诺衍生物为发光剂的化学发光底物液。

[0012] 本发明中，所述所述2倍浓缩稀释液，其成分为0.01mol/L, pH7.4的磷酸缓冲液、甘氨酸-HCl缓冲液或Tris-HCl缓冲液，使用前请按1:1稀释(1份浓缩样品稀释液+1份去离子水)。

[0013] 本发明中，所述20倍浓缩洗涤液，其包含0.05%吐温-20, 0.01mol/L的PBST, pH值范围7.0-7.5之间，使用前请按1:19稀释(1份浓缩稀释液+19份去离子水)。

[0014] 本发明的氟虫腓的化学发光免疫检测试剂盒应用于氟虫腓的检测时，检测步骤为：

(1) 预处理待测样品，即将待测试的样品处理为液体样品，或者用有机溶剂提取待测样品，氮气吹干并将其复溶于样品稀释液工作液中；

(2) 将所需试剂从冷藏环境中取出，置于室温(20~25℃)平衡30 min以上，注意每种液体试剂使用前均须摇匀；

(3) 取包被氟虫腓抗原的酶标板，加标准品/待测样品50 μL/孔到对应的微孔中，标准品和样品每个浓度做两个平行实验。

[0015] (4) 加入氟虫腓抗体工作液，50 μL/孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应45 min；

(5) 小心揭开盖板膜，将孔内液体甩干，用洗涤工作液250 μL/孔，充分洗涤4~5次，每次间隔10 s，用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破)；

(6) 加入发光底物液混合液(A液与B液在使用前按1:1混合) 100 μL/孔，轻轻振荡混匀，混合好后在化学发光检测仪内检测发光强度(RLU)。

[0016] (7) 检测结果的计算:用所获得的标准溶液和试样溶液发光值与空白溶液的比值进行计算。见下式:

$$\text{相对发光强度}=\text{RLU}/\text{RLU}_{\text{max}}$$

式中:

RLU=标准(或样品)溶液的发光强度值;

RLU<sub>max</sub>=空白(浓度为0的标准溶液)的发光强度值。

[0017] 将计算的相对发光强度值对应氟虫腓( $\mu\text{g}/\text{L}$ )的自然对数作半对数坐标系统曲线图。各待测样品的氟虫腓浓度根据其RLU值在标准曲线上查出,或通过标准曲线相应的方程计算得出。如样品处理中有稀释,应根据标准曲线所得出的样品浓度要再乘以其稀释倍数。即为样本中氟虫腓的实际浓度。

[0018] 本发明的试剂盒可用于茶叶样品中氟虫腓的残留量检测。与现有的其它检测氟虫腓残留量的实验方法比较,本发明的试剂盒有以下优点:

(1) 采用化学发光免疫法的本发明试剂盒,比色谱方法(高效液相、液质联用、气质联用)、毛细管电泳方法更为快速简便,所需仪器更为简单,检测成本更为低廉,同时具有高通量的特点。

[0019] (2) 采用化学发光免疫法的本发明试剂盒,比ELISA方法更为灵敏,可以检测出更低浓度和含量的氟虫腓残留,同时线性范围更宽。

[0020] (3) 采用化学发光免疫法的本发明试剂盒,减少了二抗的使用环节,从而缩短了检测时间;不透明白色酶标板增加了化学发光检测仪灵敏度。另外,用氟虫腓-载体蛋白偶联物而非氟虫腓抗体来包被不透明白色酶标板,减少了氟虫腓抗体的不稳定性,保证了试剂盒的长期有效性。

## 具体实施方式

[0021] 以下通过具体的实施例对本发明作进一步描述。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。

### [0022] 实施例1

#### 1、试剂盒各组分的制备

(1) 氟虫腓半抗原的制备:将氟虫腓酸化,在4℃无光低温环境中与亚硝酸钠作用,生成含重氮基正离子的中间体。重氮化的氟虫腓作为半抗原,用于后面合成免疫抗原与包被抗原。

[0023] (2) 氟虫腓-牛血清白蛋白(BSA)免疫原的制备:将氟虫腓与牛血清白蛋白(BSA)采用重氮化法进行偶联得到免疫抗原。

[0024] 氟虫腓-卵血清白蛋白(OVA)包被抗原的制备:将氟虫腓与卵血清白蛋白(OVA)采用重氮化法进行偶联得到包被抗原。

[0025] 氟虫腓-过氧化物酶标记抗体的制备:对6~8周龄的雌性BALB/c小鼠(体重18~20g),大剂量免疫方案为,首次免疫用160  $\mu\text{g}$  氟虫腓-BSA与等量弗氏完全佐剂混匀,皮下注射。3周后,再用80  $\mu\text{g}$  氟虫腓-BSA与等量弗氏完全佐剂混匀,皮下注射。此后每隔3周用80  $\mu\text{g}$  氟虫腓-BSA与等量弗氏完全佐剂混匀,腹腔注射。最后一次脾内免疫80  $\mu\text{g}$  氟虫腓-BSA作为加强免疫。三天后处死小鼠,取其脾脏,与骨髓瘤细胞融合。用间接ELISA方法筛选阳性杂

交瘤细胞。通过小鼠腹腔注射杂交瘤细胞来大量制备小鼠腹水,腹水经过过滤、离心初步纯化后,采用辛酸法和亲和层析法纯化腹水,再经透析得到纯化的氟虫腈单克隆抗体。氟虫腈单克隆抗体与辣根过氧化物酶偶联,从而得到氟虫腈-过氧化物酶标记抗体。

[0026] 包被有氟虫腈-OVA偶联物的不透明白色酶标板制备:用缓冲液将氟虫腈-OVA偶联物稀释后用于包被不透明白色酶标板的检测孔,4℃过夜后用PBST缓冲液洗涤,然后加入180 μL封闭液(5%脱脂奶粉溶液),37℃温育1.5 h,倾去孔内液体,吸水纸拍干后密封保存。

[0027] 2、检测氟虫腈的化学发光免疫检测试剂盒的组建

组建的检测氟虫腈的化学发光免疫检测试剂盒,包含了以下组成部分:

(1) 96孔不透明白色酶标板(8孔×12条)包被有氟虫腈-OVA偶联物,用铝箔袋真空密封包装。

[0028] (2) 氟虫腈标准溶液6瓶,浓度分别为:

0 ng/mL、0.02 ng/mL、0.08ng/mL、0.32ng/mL、1.28 ng/mL、5.12 ng/mL

(3) 氟虫腈-辣根过氧化物酶标记抗体溶液。

[0029] (4) 发光底物A液(鲁米诺及增强剂),发光底物B液(尿素过氧化氢)。

[0030] (5) 2倍浓缩样品稀释液。使用前请按1:1稀释(1份浓缩稀释液+1份去离子水)成为工作样品稀释液,其稀释后的工作样品稀释液为0.05 mol/L,pH 7.4的PBST缓冲液。

[0031] (6) 20倍浓缩洗涤液。使用前请按1:19稀释(1份浓缩稀释液+19份去离子水)成为工作洗涤液,其稀释后的工作洗涤液为pH值范围7.0-7.5之间,含0.05%吐温-20,0.01mol/L的PBST缓冲液。

[0032] 3、氟虫腈的化学发光免疫检测试剂盒的试用

1) 样品的前处理:茶叶

a. 取1g均质样本于50 mL离心管中,加入5 mL水,剧烈振荡1 min;

b. 加入5 mL乙腈,剧烈振荡3 min,4000g以上离心5 min;

c. 取1ml上清液于10ml玻璃试管中,50~60℃水浴氮气流下吹干;

d. 加入1ml正己烷用涡旋仪涡动30s,再加入1ml样品稀释液,涡动30s,4000 r/min离心5 min;

e. 除去上层有机相,将下层液体转移到另一洁净离心管中,用于检测。

[0033] 2) 化学发光免疫检测试剂盒

将标准和试样所需数量的孔条插入微孔板框架中,记录标准和样品的位置。于适当微孔中分别加入50 μL/孔氟虫腈标准溶液和待测样品。加入50 μL/孔氟虫腈-辣根过氧化物酶标记抗体到每一个微孔中,充分混合后于室温下避光静置温育45 min。将孔内液体甩干,用洗涤工作液充分洗涤4~5次。完全除去孔中的液体,用吸水纸拍干,加入发光底物液混合液(A液与B液在使用前按1:1混合) 100 μL/孔。混合好后立即在化学发光检测仪内检测发光强度(RLU)。

[0034] 3) 检测结果的计算分析

用所获得的标准溶液和试样溶液发光值与空白溶液的比值进行计算。见下式:

相对发光强度=RLU/RUL<sub>max</sub>

式中:

RLU=标准(或样品)溶液的发光强度值;

$RLU_{max}$ =空白(浓度为0的标准溶液)的发光强度值。

[0035] 将计算的相对发光强度值对应氟虫腓( $\mu\text{g/L}$ )的自然对数作半对数坐标系统曲线图。各待测样品的氟虫腓浓度根据其RLU值在标准曲线上查出,或通过标准曲线相应的方程计算得出。如样品经过了预先稀释,应根据标准曲线所得出的样品浓度要再乘以其稀释倍数。

#### [0036] 实施例2

检测氟虫腓的化学发光免疫检测试剂盒,包含了以下组成部分:

(1) 96孔不透明白色酶标板(8孔 $\times$ 12条)包被有氟虫腓-鼠血清白蛋白偶联物,用铝箔袋真空密封包装。

[0037] (2) 氟虫腓标准溶液6瓶,浓度分别为:

0 ng/mL、0.02 ng/mL、0.08ng/mL、0.32ng/mL、1.28 ng/mL、5.12 ng/mL

(3) 氟虫腓-辣根过氧化物酶标记抗体溶液。

[0038] (4) 发光底物A液(鲁米诺及增强剂),发光底物B液(尿素过氧化氢)。

[0039] (5) 2倍浓缩样品稀释液。使用前请按1:1稀释(1份浓缩稀释液+1份去离子水)成为工作样品稀释液,其稀释后的工作样品稀释液为0.05 mol/L,pH 7.4的Tris-HCl缓冲液。

[0040] (6) 20倍浓缩洗涤液。使用前请按1:19稀释(1份浓缩稀释液+19份去离子水)成为工作洗涤液,其稀释后的工作洗涤液为pH值范围7.0-7.5之间,含0.05%吐温-20,0.01mol/L的PBST缓冲液。

#### 实施例3

检测氟虫腓的化学发光免疫检测试剂盒,包含了以下组成部分:

(1) 96孔不透明白色酶标板(8孔 $\times$ 12条)包被有氟虫腓-鸡蛋白蛋白偶联物,用铝箔袋真空密封包装。

[0041] (2) 氟虫腓标准溶液6瓶,浓度分别为:

0 ng/mL、0.02 ng/mL、0.08ng/mL、0.32ng/mL、1.28 ng/mL、5.12 ng/mL

(3) 氟虫腓-辣根过氧化物酶标记抗体溶液。

[0042] (4) 发光底物A液(鲁米诺及增强剂),发光底物B液(尿素过氧化氢)。

[0043] (5) 2倍浓缩样品稀释液。使用前请按1:1稀释(1份浓缩稀释液+1份去离子水)成为工作样品稀释液,其稀释后的工作样品稀释液为0.05 mol/L,pH 7.4的甘氨酸-HCl缓冲液。

[0044] (6) 20倍浓缩洗涤液。使用前请按1:19稀释(1份浓缩稀释液+19份去离子水)成为工作洗涤液,其稀释后的工作洗涤液为pH值范围7.0-7.5之间,含0.05%吐温-20,0.01mol/L的PBST缓冲液。

专利名称(译)	一种检测茶叶中氟虫腈的化学发光免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN109752369A</a>	公开(公告)日	2019-05-14
申请号	CN2017111059643.3	申请日	2017-11-02
[标]申请(专利权)人(译)	镇江亿特生物科技发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	镇江亿特生物科技发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	镇江亿特生物科技发展有限公司		
[标]发明人	洪霞 杜霞 立雯馨		
发明人	洪霞 杜霞 立雯馨		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种检测氟虫腈的化学发光免疫检测试剂盒，属于免疫学检测领域。本发明的试剂盒由包被有氟虫腈-载体蛋白偶联物的不透明白色酶标板、氟虫腈标准品、氟虫腈-过氧化物酶标记抗体工作液、发光底物液、浓缩样品稀释液、浓缩洗涤液组成。所述氟虫腈-载体蛋白偶联物是将氟虫腈与载体蛋白通过混合酸酐法或碳二亚胺法偶联得到，浓缩洗涤液含有0.05%吐温-20。与传统的酶联免疫吸附分析法比较，本发明的试剂盒具有更高的灵敏度，且检测时间短、费用低，可用于茶叶样品中氟虫腈的残留量检测。