

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510101907.8

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2006年7月19日

[11] 公开号 CN 1804631A

[22] 申请日 2005.12.2

[21] 申请号 200510101907.8

[71] 申请人 广东工业大学

地址 510090 广东省广州市东风东路 729 号

[72] 发明人 赵肃清 孙远明 蔡燕飞

[74] 专利代理机构 广州粤高专利代理有限公司

代理人 林丽明

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称

一种检测甲胺磷农药残留的免疫胶体金试剂及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种检测甲胺磷农药残留的免疫胶体金试剂及其制备方法，该试剂由 PVC 背衬底端依次粘附的样品垫、结合垫，中间粘附的硝酸纤维膜，顶端粘附的吸水垫组成，上述结合垫上包被了抗甲胺磷单克隆抗体 - 胶体金标记物，硝酸纤维膜上包被了甲胺磷 - PDL 偶联物和羊抗鼠 IgG；该试剂的制备方法，包括以下步骤：(1) 甲胺磷 - PDL 偶联物的制备；(2) 抗甲胺磷的单克隆抗体制备；(3) 胶体金标记抗甲胺磷的单克隆抗体；(4) 胶体金结合垫、硝酸纤维膜的包被与封闭；(5) 试剂条的组装；该试剂特异性强，能在 15min 内适于现场快速检测甲胺磷农药残留。

1. 一种检测甲胺磷农药残留的免疫胶体金试剂，其特征在于：该试剂由 PVC 背衬底端依次粘附的样品垫、结合垫，中间粘附的硝酸纤维膜，顶端粘附的吸水垫组成，其中结合垫上包被了抗甲胺磷单克隆抗体—胶体金标记物，硝酸纤维膜上包被了甲胺磷—PDL 偶联物和羊抗鼠 IgG。

2. 一种检测甲胺磷农药残留的免疫胶体金试剂的制备方法，其特征在于：该试剂的制备方法包括以下步骤：（1）甲胺磷—PDL 偶联物的制备；（2）抗甲胺磷的单克隆抗体制备；（3）胶体金标记抗甲胺磷的单克隆抗体；（4）胶体金结合垫、硝酸纤维膜的包被与封闭；（5）试剂条的组装。

3. 根据权利要求 2 所述的一种检测甲胺磷农药残留的免疫胶体金试剂的制备方法，其特征在于：上述步骤（1）中的甲胺磷—PDL 偶联物的制备是以多聚赖氨酸（PDL）为载体，PDL 浓度为 0.5~0.9% 的水溶液，冰水浴搅拌下逐滴直接加入纯度为 99% 的 O, S-二甲基硫代磷酰氯，加入量为 PDL 水溶液总体积的 5/100~15/100，冰浴磁力搅拌反应 0.5h 后，取水层装入透析袋经透析和冷冻干燥即得甲胺磷—PDL 偶联物。

4. 根据权利要求 2 所述的一种检测甲胺磷农药残留的免疫胶体金试剂的制备方法，其特征在于：上述步骤（2）中抗甲胺磷的单克隆抗体制备是：取甲胺磷—PDL 偶联物与佐剂混合乳化，免疫 Balb/c 小鼠共 4 次，取小鼠的脾细胞与杂交瘤细胞融合，筛选抗甲胺磷的单克隆抗体细胞株，并用获得的细胞诱导小鼠产生腹水，纯化后获得大量抗甲胺磷的单克隆抗体。

5. 根据权利要求 2 所述的一种检测甲胺磷农药残留的免疫胶体金试剂的制备方法，其特征在于：上述步骤（3）中胶体金标记抗甲胺磷的单克隆抗体是：将胶体金与抗甲胺磷的单克隆抗体按 1: 0.01~1: 0.03 mL/mg 的比例混合形成稳定的金标抗体，纯化后得到胶体金标记抗甲胺磷单克隆抗体。

6. 根据权利要求 2 所述的一种检测甲胺磷农药残留的免疫胶体金试剂的制备方法，其特征在于：上述步骤（4）中胶体金结合垫、硝酸纤维膜的包被与封闭：将上述胶体金标记的抗甲胺磷单克隆抗体包被在胶体金结合垫上，而甲胺磷—PDL 偶联物和羊抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维膜的检测区和质控区，充分干燥。

7. 根据权利要求 2 所述的一种检测甲胺磷农药残留的免疫胶体金试剂的制备方法，其特征在于：上述步骤（5）试剂条的组装：在 PVC 背衬底端依次粘附样品垫、胶体金结合垫，中间粘附包含甲胺磷—PDL 偶联物（检测线形成区）和羊抗鼠 IgG 的硝酸纤维膜（质控线形成区），顶端粘附吸水垫，PVC 背衬上样品垫区标示向下方向的箭头和样品液面最高浸入的横线，然后将粘好的 PVC 材料切成等宽度的试剂条用铝箔袋封装即制成检测甲胺磷的免疫胶体金试剂。

一种检测甲胺磷农药残留的免疫胶体金试剂及其制备方法

技术领域

本发明属于分析化学领域，具体涉及一种检测甲胺磷农药残留的免疫胶体金试剂及其制备方法。

背景技术

甲胺磷 (Methamidophos), O, S-二甲基硫代磷酰胺, 是我国生产吨位最大种类的有机磷农药, 在防治作物病虫害和促进作物增收方面起了很重要的作用, 但由于违禁使用甲胺磷导致食用甲胺磷农药残留过高的蔬菜而引起的中毒事件和因甲胺磷农药残留超标造成的出口退货时有发生。很有必要加强甲胺磷安全监测工作。

目前对甲胺磷的检测方法主要有气相色谱法、高效液相色谱法、单扫描示波极谱法、薄层层析法、分光光度法、直接电位法等, 这些方法需用复杂昂贵的仪器, 而且每种方法都要经过繁琐的前处理, 很难达到快速、简便的现场检测要求。国内南京农业大学、华中农业大学和华南农业大学都相继开展过甲胺磷的免疫测定方法研究 (刘凤权等. 定量测定甲胺磷残留的间接竞争 ELISA 的建立和初步应用. 农业生物技术学报. 1998, 6(2): 140-146; 董国伟等. 兔抗甲胺磷多克隆抗体的制备. 华中农业大学学报. 2001, 20(4): 340-343; 赵肃清, 孙远明等. 甲胺磷单克隆抗体制备与鉴定研究. 免疫学杂志. 2003, 19(2): 142~145), 但至今未见甲胺磷农药免疫测定方法推广应用的报道。我国政府已发文从 2007 年开始, 全面禁止甲胺磷农药的使用, 为了防止不法商贩在 2007 年以后使用甲胺磷的复配农药, 更有必要建立特异并能现场检测甲胺磷残留的方法, 其中免疫胶体金方法就是一种行之有效的方法。

为了建立免疫胶体金分析方法, 首先必须得到抗甲胺磷的抗体。甲胺磷分子结构简单, 分子量 (141) 小, 属于半抗原, 不能直接免疫制取抗体, 必须先合成甲胺磷的人工抗原。国内现有甲胺磷人工抗原合成方法的专利 (专利号 ZL 01114706.7)。但该专利方法中合成的甲胺磷人工抗原缺乏桥结构, 产生针对甲胺磷的抗体特异性不强。赵肃清等借用该专利方法以赖氨酸为桥结构合成甲胺磷的人工抗原 (赵肃清等. 甲胺磷人工抗原的光谱学鉴定研究. 光谱学与光谱分析. 2004. 2: 207-209), 并以合成的甲胺磷人工抗原免疫小鼠后经细胞融合和抗体筛选, 获得抗甲胺磷的单克隆抗体细胞株, 但纯化的抗体仍不能满足用于建立甲胺磷的胶体金免疫测定方法的需要。为此, 本专利以多聚赖氨酸 (PDL, 分子量 30000—70000) 为抗原, 通过多聚赖氨酸上的氨基与 O, S-二甲基硫代磷酰氯直接反应, 从而在多聚赖氨酸上形成具有甲胺磷的分子结构, 制备成为甲胺磷—PDL 偶联物作为人工抗原, 由于多聚赖氨酸基本不具备抗原性, 产生的抗甲胺磷的抗体比用其它载体制备的偶联物产生的抗体特异性强, 因此, 经细胞融合和抗体筛选后顺利获得抗甲胺磷的单克隆抗体, 再通过胶体金的标记和纯化终于制备成功检测甲胺磷农药残留的免疫胶体金试剂。

发明内容

本发明的目的在于建立一种甲胺磷的快速测定方法，以满足蔬菜市场、海关和基层对甲胺磷农药残留的快速检测需要，防止甲胺磷中毒事件发生，保障人们的身体健康。

该发明中的检测甲胺磷农药残留的免疫胶体金试剂由 PVC 背衬底端依次粘附的样品垫、结合垫，中间粘附的硝酸纤维膜，顶端粘附的吸水垫组成，其中结合垫上包被了抗甲胺磷—胶体金标记物，硝酸纤维膜上包被了甲胺磷—PDL 偶联物和羊抗鼠 IgG。

该试剂的制备方法如下：

(1) 甲胺磷—PDL 偶联物的制备；(2) 抗甲胺磷的单克隆抗体制备；(3) 胶体金标记抗甲胺磷的单克隆抗体；(4) 胶体金结合垫、硝酸纤维膜的包被与封闭；(5) 试剂条的组装。

1 甲胺磷—PDL 偶联物的制备：取 0.5—0.9% PDL 放入 1 个 10mL 的小烧杯内，加入相应量的双蒸水，冰水中静置 20min，然后逐滴加入上述总体积 5/100—15/100 的 O, S-二甲基硫代磷酰氯（纯度 99%），冰浴磁力搅拌 0.5h，取水层装入透析袋，悬于 1000mL 的烧杯并置 4℃ 冰箱内，每 6h 用双蒸水换水一次，共透析 2d 后，收集透析液，2000r/min 4℃ 离心 5min，收集上清液，冷冻干燥即为甲胺磷—PDL 偶联物。

2 抗甲胺磷的单克隆抗体制备：取甲胺磷—PDL 偶联物与佐剂混合乳化，免疫 Balb/c 小鼠共 4 次，取小鼠的脾细胞与杂交瘤细胞融合，ELISA 方法筛选抗甲胺磷的单克隆抗体细胞株，并用获得的细胞诱导小鼠产生腹水，纯化后获得大量抗甲胺磷的单克隆抗体。

3 胶体金标记抗甲胺磷的单克隆抗体：将胶体金与抗甲胺磷的抗体按 1:0.01—1:0.03 (mL/mg) 的比例混合形成稳定的金标抗体，纯化后得到胶体金标记抗甲胺磷抗体。

4 胶体金结合垫、硝酸纤维膜的包被与封闭：将上述胶体金标记的抗甲胺磷单克隆抗体包被在胶体金结合垫上，而甲胺磷—PDL 偶联物和羊抗鼠 IgG（羊抗鼠 IgG 从试剂公司购买）包被在硝酸纤维膜的检测区和控制区，充分干燥。

5 试剂条的组装：在 PVC 背衬底端依次粘附样品垫、胶体金结合垫，中间粘附包含甲胺磷—PDL 偶联物和羊抗鼠 IgG（羊抗鼠 IgG 从试剂公司购买）的硝酸纤维膜，顶端粘附吸水垫，PVC 背衬上样品垫区标示向下方向的箭头和样品液面最高浸入的横线，然后将粘好的 PVC 材料切成等宽度的试剂条用铝箔袋封装即制成检测甲胺磷的免疫胶体金试剂。

本发明具有操作简便，成本低，检测快速和适于现场检测甲胺磷农药残留的优点，且批量生产后易于推广和使用。

具体实施方式

该发明中的检测甲胺磷农药残留的免疫胶体金试剂由 PVC 背衬底端依次粘附的样品垫、结合垫，中间粘附的硝酸纤维膜，顶端粘附的吸水垫组成，其中结合垫上包被了抗甲胺磷—胶体金标记物，硝酸纤维膜上包被了甲胺磷—PDL 偶联物和羊抗鼠 IgG。

该试剂的制备方法如下：

(1) 甲胺磷—PDL 偶联物的制备；(2) 抗甲胺磷的单克隆抗体制备；(3) 胶体金标记

抗甲胺磷的单克隆抗体；(4) 胶体金结合垫、硝酸纤维膜的包被与封闭；(5) 试剂条的组装。

1 甲胺磷—PDL 偶联物的制备：取 16.0mg L-多聚-D-赖氨酸 (PDL, Sigma P7890) 放入 1 个 10mL 的小烧杯内, 加入 2mL 双蒸水, 冰水中静置 20min, 然后逐滴加入 0.10mL 99% 的 O, S-二甲基硫代磷酰氯, 冰浴磁力搅拌 0.5h, 取水层装入透析袋, 悬于 1000mL 的烧杯并置 4℃冰箱内, 每 6h 用双蒸水换水一次, 共透析 2d 后, 收集透析液, 2000r/min 4℃离心 5min, 收集上清液, 冷冻干燥即为甲胺磷—PDL 偶联物。

2 抗甲胺磷的单克隆抗体制备：取甲胺磷—PDL 偶联物首次与弗氏完全佐剂等量混合乳化, 第 2、3 和 4 次与不完全弗氏佐剂等量混合乳化后免疫 Balb/c 小鼠共 4 次, 取小鼠的脾细胞与杂交瘤细胞融合, 直接和间接竞争 ELISA 方法筛选抗甲胺磷的单克隆抗体细胞株, 并用获得的细胞诱导小鼠产生腹水, 纯化后获得大量抗甲胺磷的单克隆抗体。

3 制备胶体金：将 100mL 0.02% 的氯化金用 1 mL 1% 的柠檬酸三钠还原成 20nm 大小的胶体金。

4 胶体金标记抗甲胺磷的单克隆抗体：用 0.1mol/L Na_2CO_3 将上述胶体金溶液的 pH 调至 8.0, 然后将 100 mL 胶体金与 1 mg 抗甲胺磷的单克隆抗体混合均匀, 并通过离心和清洗获得纯化的金标甲胺磷抗体。

5 结合垫、硝酸纤维膜的包被与封闭：用 Biodot 点膜机将上述胶体金标记的抗甲胺磷单克隆抗体包被在胶体金结合垫上, 而甲胺磷—PDL 偶联物和羊抗鼠 IgG (羊抗鼠 IgG 从试剂公司购买) 包被并封闭在硝酸纤维膜的检测区和质控区, 充分干燥。

6 试剂条的组装：将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维膜和吸水垫依次粘在 PVC 背衬上, PVC 背衬上样品垫区标示向下方向的箭头和样品液面最高浸入的横线, 然后将粘好的 PVC 材料切成等宽度的试剂条用铝箔袋封装即制成检测甲胺磷的免疫胶体金试剂。

检测时, 先将试剂条从 4℃冰箱取出, 室温放置 5 min 后, 从铝箔袋中取出试剂条, 按向下标记的箭头方向将试剂条浸入样品液中, 液面不得超过样品结合的标记线, 8—10 min 钟后取出, 平放在干净的桌面上进行结果判断：如果检测线不出现红色条带, 而质控线出现红色条带, 则表明有甲胺磷农药残留存在, 结果为阳性；如果检测线和质控线均出现红色条带, 则表明没有甲胺磷农药残留存在, 结果为阴性；如果质控线不出现红色条带, 则说明试剂条失效。

专利名称(译)	一种检测甲胺磷农药残留的免疫胶体金试剂及其制备方法		
公开(公告)号	CN1804631A	公开(公告)日	2006-07-19
申请号	CN200510101907.8	申请日	2005-12-02
[标]申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
[标]发明人	赵肃清 孙远明 蔡燕飞		
发明人	赵肃清 孙远明 蔡燕飞		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/532		
代理人(译)	林丽明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测甲胺磷农药残留的免疫胶体金试剂及其制备方法，该试剂由PVC背衬底端依次粘附的样品垫、结合垫，中间粘附的硝酸纤维膜，顶端粘附的吸水垫组成，上述结合垫上包被了抗甲胺磷单克隆抗体-胶体金标记物，硝酸纤维膜上包被了甲胺磷-PDL偶联物和羊抗鼠IgG；该试剂的制备方法，包括以下步骤：(1)甲胺磷-PDL偶联物的制备；(2)抗甲胺磷的单克隆抗体制备；(3)胶体金标记抗甲胺磷的单克隆抗体；(4)胶体金结合垫、硝酸纤维膜的包被与封闭；(5)试剂条的组装；该试剂特异性强，能在15min内适于现场快速检测甲胺磷农药残留。