



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105301233 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201510517049. 9

(22) 申请日 2015. 08. 21

(71) 申请人 贵州勤邦食品安全科学技术有限公司

地址 550009 贵州省贵阳市小河区小孟工业园标准厂房二期 1# 楼 1-2 楼

(72) 发明人 冯才伟 崔海峰 何方洋 冯静
万宇平 谢体波 扶胜 陆苇
魏丽丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

检测茶叶中吡虫啉残留的酶联免疫试剂盒及使用方法

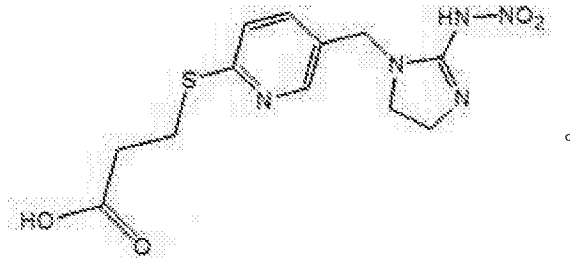
(57) 摘要

本发明提供了一种检测茶叶中吡虫啉残留的酶联免疫试剂盒及其使用方法,它包括:包被有吡虫啉偶联抗原的酶标板、吡虫啉标准品溶液、酶标二抗、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于快速检测茶叶中吡虫啉的含量,具有操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查的优点。

1. 一种检测茶叶中吡虫啉残留的酶联免疫试剂盒,其特征包括:包被有偶联抗原的酶标板、吡虫啉标准品溶液、酶标二抗、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在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,载体蛋白可为牛血清白蛋白、人血清蛋白、卵清蛋白。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在在于所述吡虫啉半抗原是由氧化还原反应得到,分子结构式为:



4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在在于所述吡虫啉特异性抗体是以吡虫啉偶联抗原作为免疫原制备获得,所述吡虫啉特异性抗体优选吡虫啉单克隆抗体。

5. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在在于所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶,底物显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲,底物显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,终止液为 1~2mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液。

6. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在在于所述洗涤液为 pH 值 7.4,含有 0.5%~1.0% 吐温-20、0.01%~0.03% 叠氮化钠防腐剂、0.1~0.3mol/L 的磷酸盐缓冲液;所述复溶液为 pH 值 7.0、0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

7. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在在于所述吡虫啉标准品溶液的浓度分别为 0 μg/L、1 μg/L、3 μg/L、9 μg/L、27 μg/L。

检测茶叶中吡虫啉残留的酶联免疫试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明属于酶联免疫检测领域,具体涉及一种检测茶叶中吡虫啉残留的酶联免疫试剂盒及其使用方法。

背景技术

[0002] 吡虫啉(Imidacloprid),又称咪蚜胺、蚜虱净,是新一代氯代尼古丁杀虫剂,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、胃毒和内吸多重药效。害虫接触药剂后,中枢神经正常传导受阻,使其麻痹死亡。速效性好,药后1天即有较高的防效,残留期长达25天左右。药效和温度呈正相关,温度高,杀虫效果好,生产上主要用于防治刺吸式口器害虫。

[0003] 吡虫啉杀虫谱较广,包括同翅目、缨翅目、鞘翅目、双翅目及鳞翅目等,尤其对刺吸式害虫具有内吸性和高残效的特点,目前,吡虫啉在世界范围内的销售额位列杀虫剂的首位。吡虫啉制剂产品,在我国已获得在茶树上的登记使用,用于防治茶树上的主要害虫小绿叶蝉、黑刺粉虱,效果优于噻嗪酮、醚菊酯、抗蚜威和杀螟丹等农药。日本规定吡虫啉在茶叶中的限量标准为10mg/kg,我国规定茶叶中吡虫啉最大残留限量为0.5mg/kg。

[0004] 我国茶叶品质优良、口感独特、营养丰富,是我国浙江、贵州、福建等省的重要经济作物,我国茶文化源远流长,茶叶是我国百姓生活中,必不可少的饮品,同时,我国出产的茶叶,深受国际市场的青睐,远销欧盟、日本、韩国、美国等国家和地区。

[0005] 从现有技术和相关检测标准看,目前针对吡虫啉残留的检测方法主要是仪器方法,高效液相法(HPLC)、气相色谱法(GC)、电化学分析法(EA)、气相色谱质谱联用法(GC-MS)等,仪器方法具备检测灵敏度高、特异性强等优势,但是检测样本前处理繁琐、耗时,样品还需提取和净化处理,同时仪器检测方法需要昂贵的大型仪器和设备、配备专业的检测技术人员,进行操作和管理,无法进行现场大规模检测,时效性差,难以推广。近年来药物残留免疫检测技术已经在食品质量安全快速检测中,得到了广泛的应用,且逐渐被人们所认可,酶联免疫检测技术具有样品前处理简单,检测快速、灵敏、特异性好、准确度高等特点,能够满足现场快速检测的要求,从而弥补仪器检测的不足。

[0006] 在国际市场竞争日益激烈、食品安全日益重视的今天,寻求茶叶中快速检测农药残留的有效手段至关重要。本发明提供的吡虫啉残留酶联免疫试剂盒只需一步反应,耗时45分钟,即可得到检测结果,且检测限为100 μ g/kg,灵敏度可达1 μ g/kg,优于同类产品。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种能够检测茶叶样本中吡虫啉残留量的酶联免疫试剂盒,并提供一种高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检测方法。

[0008] 本发明试剂盒,它包括:包被有包被原的酶标板、吡虫啉标准品溶液、酶标二抗、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液,所述包被原为吡虫啉偶联抗原,所述酶标记物为酶标记抗体。

[0009] 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,所述吡虫啉半抗原是由氧化还原反应得到,所述载体蛋白可为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或纤维蛋白原,优选牛血清蛋白和卵清蛋白。

[0010] 所述吡虫啉特异性抗体是以吡虫啉偶联抗原作为免疫原制备获得,所述吡虫啉特异性抗体可为吡虫啉单克隆抗体或吡虫啉多克隆抗体,其中优选吡虫啉单克隆抗体。

[0011] 所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体,其中优选羊抗鼠抗抗体。

[0012] 所述酶标二抗的标记酶为辣根过氧化物酶;酶标二抗是采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶与抗抗体进行偶联得到的。

[0013] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括吡虫啉标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液。

[0014] 所述吡虫啉标准品溶液 5 瓶,浓度分别为 $0\ \mu\text{g/L}$ 、 $1\ \mu\text{g/L}$ 、 $3\ \mu\text{g/L}$ 、 $9\ \mu\text{g/L}$ 、 $27\ \mu\text{g/L}$ 。

[0015] 当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物显色液由底物显色 A 液和底物显色 B 液组成,A 液为过氧化氢或过氧化脲,B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,所述终止液为 $1\sim 2\text{mol/L}$ 的硫酸或盐酸缓冲液。

[0016] 所述洗涤液优选为 pH 值 7.4,含有 0.5%~1.0% 吐温-20、0.01%~0.03% 叠氮化钠防腐剂、0.1~0.3mol/L 的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0017] 所述复溶液优选为 pH 值 7.0,0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0018] 其中在酶标板制备过程中所用到的包被缓冲液为 pH 值 9.6,0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液,封闭液为 pH 值 7.1~7.5,含有 1%~3% 酪蛋白、0.1~0.3mol/L 的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0019] 本发明中酶标板的制备过程为:用包被缓冲液将包被原稀释成 $20\ \mu\text{g/ml}$,每孔加入 $100\ \mu\text{l}$, 37°C 避光孵育 2h 或 4°C 过夜,倾去孔中液体,用洗涤液洗涤 1 次,每次 30s,拍干,然后在每孔中加入 $150\ \mu\text{l}$ 封闭液, 37°C 避光孵育 1~2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0020] 本发明的检测原理为:

在微孔条上预包被吡虫啉偶联抗原,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入吡虫啉特异性抗体溶液,样本中的吡虫啉与酶标板上包被的吡虫啉偶联抗原竞争抗吡虫啉特异性抗体,加入酶标记抗抗体进行放大作用,用显色液显色,样本吸光度值与吡虫啉的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得到样本中吡虫啉的残留量;同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中吡虫啉残留量的浓度范围。若无酶标仪,则不加终止液,用目测法可进行判定。

[0021] 本发明检测吡虫啉的酶联免疫试剂盒主要采用竞争 ELISA 方法定性或定量检测样品中吡虫啉的含量;对样品的前处理要求低,样品前处理过程简单,能同时快速检测大批量样品;主要试剂以工作液的形式提供,检验方法方便易行,具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。本发明的酶联免疫试剂盒,结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利、检测方法高效、准确、简便的特点,适于大批量样品筛选的定性、定量。

附图说明

- [0022] 图 1 :吡虫啉半抗原合成路线图 ;
图 2 :吡虫啉半抗原核磁共振氢谱图 ;
图 3 :试剂盒标准曲线图。

具体实施方式

[0023] 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,而不是来限制本发明的范围。

[0024] 实施例 1 试剂盒组分的制备

1、吡虫啉半抗原的制备

25ml 三角瓶中加入吡虫啉 0.10g,加入适量二氯甲烷,使其完全溶解,加入 5ml 巯基丙酸,加入 1.0-2.0g 氢氧化钾作为催化剂,加热回流,提取纯化,干燥所得淡黄色固体即为吡虫啉半抗原,如图 1 所示。

取上述产物经核磁共振氢谱测定,如图 2 所示,4.7ppm 左右的峰为咪唑啉环上的两个亚甲基信号峰,5.0ppm 左右的峰为苜基信号峰,7.2-8.7ppm 为氨基与芳环混合信号峰,说明目标半抗原合成成功。

[0025] 2、抗原的制备

称取 32.5mg 半抗原溶解于 2mL DMF 溶液中,加入 60mg EDC 和 60mg NHS (溶于 2mL 水中)进行活化 30 分钟,加入到 100-250mg 载体蛋白 BSA (溶于 3mL 水中)进行偶联制备出免疫原,用 0.02mol/L PB 缓冲液透析 3 天,每天早晚更换透析液,透析完成后用于动物免疫制备出抗体。同样的方法将半抗原与载体蛋白 OVA 进行偶联制出包被原用于抗体检测。

[0026] 3、吡虫啉单克隆抗体的制备

动物免疫 :将上述步骤得到的免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内,免疫剂量为 200 μ g/只,使其产生抗血清。

[0027] 细胞融合和克隆化 :小鼠血清测定结果较高后,取其脾细胞,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 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,直到得到分泌吡虫啉单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0028] 细胞冻存和复苏 :将单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 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 $^{\circ}$ C 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0029] 单克隆抗体的生产与纯化 :将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只,7 天后腹腔注射稳定的单克隆杂交瘤细胞株 5×10^5 个 /只,7 天后采集腹水。用辛酸 - 饱和硫酸铵法进行腹水纯化, -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0030] 4、羊抗鼠抗抗体的制备

以羊为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原免疫无病原体羊,得到羊抗鼠抗抗体。

[0031] 5、酶标记抗抗体的制备

将羊抗鼠抗抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 采用改良后的过碘酸钠法进行偶联。改良后的反应体系中酶与抗体的摩尔浓度比为 1.8-2.5:1。

[0032] 6、酶标板的制备

用包被缓冲液将包被原稀释成 $20 \mu\text{g/ml}$ ，每孔加入 $100 \mu\text{l}$ ， 37°C 避光孵育 2h，倾去孔中液体，用洗涤液洗涤 1 次，每次 30s，拍干，然后在每孔中加入 $150 \mu\text{l}$ 封闭液， 37°C 避光孵育 2h，倾去孔内液体拍干，干燥后用铝膜真空密封保存。

[0033] 实施例 2 检测吡虫啉的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测吡虫啉的酶联免疫试剂盒，包含下述组分：

- (1) 包被吡虫啉偶联抗原的酶标板；
- (2) 吡虫啉标准品溶液 5 瓶，浓度分别为 $0 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \mu\text{g/L}$ 、 $3 \mu\text{g/L}$ 、 $9 \mu\text{g/L}$ 、 $27 \mu\text{g/L}$ ；
- (3) 抗体浓缩液；
- (4) 酶标二抗；
- (5) 底物显色液由底物显色 A 液和底物显色 B 液组成，底物显色 A 液为过氧化脲，底物显色 B 液为四甲基联苯胺；
- (6) 终止液为 2mol/L 硫酸；
- (7) 洗涤液为 pH 值 7.4，含有 0.5%~1.0% 吐温-20、0.01%~0.03% 叠氮化钠防腐剂、 $0.1\sim 0.3\text{mol/L}$ 的磷酸盐缓冲液，所述百分比为重量体积百分比；
- (8) 复溶液为 pH 值 7.0， 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液，所述百分比为重量体积百分比。

[0034] 实施例 3 茶叶中吡虫啉残留的检测

1、样品前处理

称取 1.0g 粉碎后茶叶样本至 50ml 聚苯乙烯离心管中，加入 5ml 甲醇，用振荡器振荡 1min， 3000g 室温下离心 5min，移取上清 $50 \mu\text{l}$ 至 2ml 洁净干燥聚苯乙烯离心管中，加入 $950 \mu\text{l}$ 复溶液，用涡旋仪涡动混匀，取 $50 \mu\text{l}$ 用于分析。

[0035] 2、抗体浓缩液与酶标二抗混合：将抗体浓缩液和酶标二抗以 1:10 的体积混合（即 1 份抗体浓缩液与 10 份酶标二抗混合）。

[0036] 3、用试剂盒检测

向包被有吡虫啉偶联抗原的酶标板微孔中加入吡虫啉标准品溶液或经前处理的样品溶液 $50 \mu\text{l}$ /孔，然后加入抗体浓缩液与酶标二抗的混合液 $50 \mu\text{l}$ /孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置 25°C 避光环境中反应 30min；小心揭开盖板膜，倒出孔内液体，每孔加入 $250 \mu\text{l}$ 洗涤液充分洗涤 4~5 次，每次间隔 10s，用吸水纸拍干；每孔加入底物显色 A 液 $50 \mu\text{l}$ ，底物显色 B 液 $50 \mu\text{l}$ ，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置 25°C 避光显色 15min；每孔加入终止液 2mol/L 硫酸 $50 \mu\text{l}$ ，轻轻振荡混匀，用酶标仪波长设定在 450nm 处（建议用双波长 450/630nm 检测，请在 5min 内读完数据），测定每孔吸光度值（OD 值）。

[0037] 4、检测结果分析

标准品或样本的平均吸光度值（双孔）除以第一个标准品（0 标准）的平均吸光度值，再乘以 100%，得到标准品或样本的百分吸光度值。以标准品百分吸光率为纵坐标，以吡虫啉标准品浓度（ $\mu\text{g/L}$ ）为横坐标，绘制标准曲线图，如图 3 所示。将样本的百分吸光率代入标准曲线中，从标准曲线上读出样本所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样本中吡虫啉实际浓度。

[0038] 实施例 4 吡虫啉技术参数的确定试验

1、试剂盒灵敏度和检测限

按照常规方法测定试剂盒灵敏度，试剂盒标准曲线最低点为 $1 \mu\text{g/L}$ ，标准曲线的范围

为 1~27 $\mu\text{g/L}$, IC_{50} (50% 抑制浓度) 浮动范围为 11~15 $\mu\text{g/L}$; 对 20 份样品进行检测, 从标准曲线上查出对应于各百分吸光度值的浓度, 以 20 份样本浓度的平均值加上 3 倍标准差表示检测限, 结果得该方法对样本的检测限为 100 $\mu\text{g/kg}$, 灵敏度 1 $\mu\text{g/kg}$ 。

[0039] 2、样本精密度和准确度试验

以回收率作为准确度评价指标, 重复测定某一浓度样品的检测结果相对标准偏差 (RSD%) 作为精密度评价指标。计算公式为: $\text{回收率}(\%) = \text{实际测定值} / \text{理论值} \times 100\%$, 其中理论值为样品的添加浓度; $\text{相对标准偏差 RSD}\% = \text{SD}/\bar{X} \times 100\%$, 其中 SD 为标准偏差, \bar{X} 为测定数据的平均值。

[0040] 按 50、150 $\mu\text{g/kg}$ 、450 $\mu\text{g/kg}$ 三个浓度吡虫啉对茶叶样品进行添加回收测定, 每个样品做 3 个平行, 用三批不同试剂进行测定, 计算样品的平均回收率及精密度, 平均回收率在 89.5%~101.2% 之间; 批内、批间相对标准偏差均小于 10%。

[0041]

[0042] 3、试剂盒稳定性试验

试剂盒保存条件为 2~8 $^{\circ}\text{C}$, 经过 12 个月的测定, 试剂盒的最大吸光度值(零标准)、50% 抑制浓度、吡虫啉添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中, 会有非正常保存条件出现, 将试剂盒在 37 $^{\circ}\text{C}$ 保存条件下放置 12 天, 进行加速老化实验, 结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生, 将试剂盒放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻 7 天, 测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 至少保存 12 个月以上。

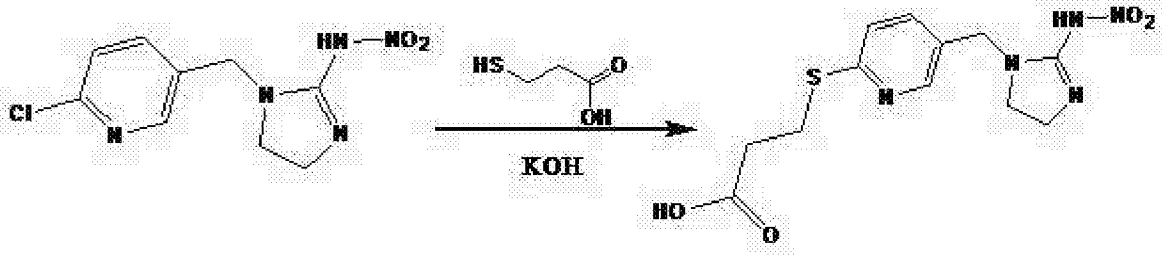


图 1

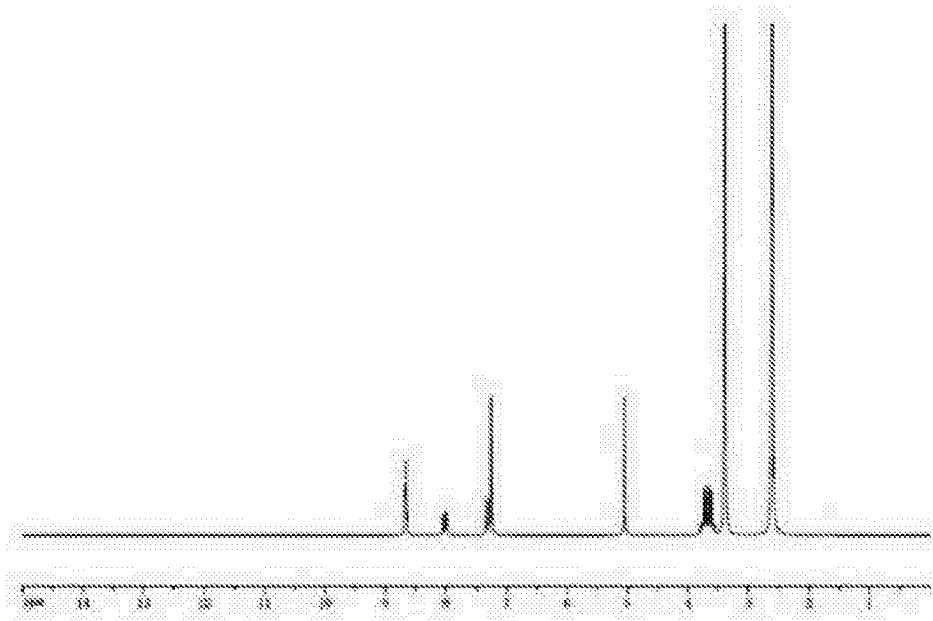


图 2

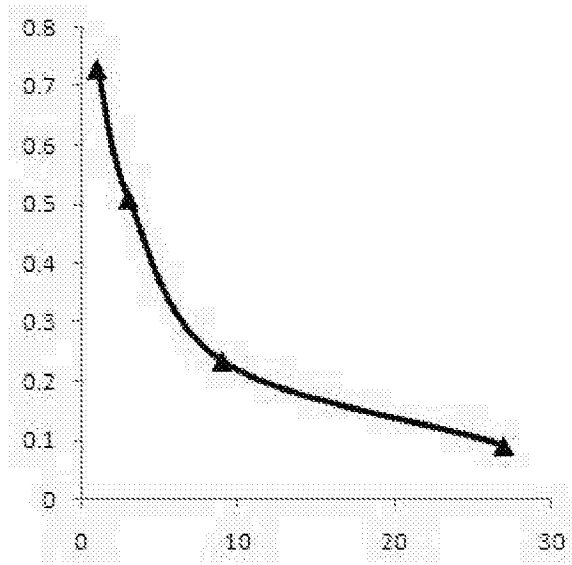


图 3

专利名称(译)	检测茶叶中吡虫啉残留的酶联免疫试剂盒及使用方法		
公开(公告)号	CN105301233A	公开(公告)日	2016-02-03
申请号	CN201510517049.9	申请日	2015-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	贵州勤邦食品安全科学技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	贵州勤邦食品安全科学技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	贵州勤邦食品安全科学技术有限公司		
[标]发明人	冯才伟 崔海峰 何方洋 冯静 万宇平 谢体波 扶胜 陆苇 魏丽丽		
发明人	冯才伟 崔海峰 何方洋 冯静 万宇平 谢体波 扶胜 陆苇 魏丽丽		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测茶叶中吡虫啉残留的酶联免疫试剂盒及其使用方法，它包括：包被有吡虫啉偶联抗原的酶标板、吡虫啉标准品溶液、酶标二抗、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于快速检测茶叶中吡虫啉的含量，具有操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查的优点。

