

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810119156.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2010年3月3日

[11] 公开号 CN 101661041A

[22] 申请日 2008.8.28

[21] 申请号 200810119156.6

[71] 申请人 北京万华生物工程有限公司

地址 100088 北京市昌平区科技园区永安路  
47号

[72] 发明人 万积成

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

[54] 发明名称

针对氨基甲酸酯类农药多残留检测的胶体金快速检测装置

[57] 摘要

本发明为一种针对氨基甲酸酯类农药多残留检测的胶体金快速检测装置，是由检测板和胶体金试纸两部分组成，根据专门针对每一种氨基甲酸酯类农药设计的半抗原，合成对应的氨基甲酸酯类农药小分子人工免疫原，通过免疫筛选，得到相应品种灵敏度高、特异性强的单克隆抗体，利用胶体金层析法制得不同氨基甲酸酯类农药品种的胶体金检测试纸，设置检测板内凹槽数量与试纸对应，试纸通过凹槽固定于检测板内部。本发明应用免疫胶体金法检测氨基甲酸酯类农药残留，实现氨基甲酸酯类农药的半定量多残留检测方法，该方法具有快速、灵敏、操作简便、成本低、无需专业人员检测，真正达到复杂原理与简易操作的有机统一，同时具有保存方便，有效期长的特点。

1. 针对氨基甲酸酯类农药多残留检测的胶体金快速检测装置，是由检测板（1）和胶体金试纸（8）两部分组成，其特征在于根据专门针对每一种氨基甲酸酯类农药设计的半抗原，合成小分子人工免疫原，通过免疫筛选，得到灵敏度高、特异性强的单克隆抗体，利用胶体金层析法制得试纸，试纸通过工艺方法固定于检测板内部。
2. 根据权利要求1所述的一种针对氨基甲酸酯类农药多残留检测的胶体金快速检测装置，其特征在于检测板包括板身（2）和板盖（3）两部分，检测板由硬度适中的材料制成，板身正面有结果显示窗（7）和指示检测对象的标签（6），同时印刷有检测人员信息登记栏（4）和结果判断说明（5），板身内部设置有与试纸条对应的凹槽（17），凹槽数量为5条以上，胶体金试纸数量与凹槽数量对应，板身和板盖通过卡扣方式连接。
3. 根据权利要求1所述的一种针对氨基甲酸酯类农药多残留检测的胶体金快速检测装置，其特征在于胶体金试纸（8）固定于板身（2）内部，是由底板（9）、吸水板（10）、标签（6）、硝酸纤维素膜（11）、单克隆抗体金标垫（12）、样品吸液层（13）、MAX线（16）组成，底板（9）中部为硝酸纤维素膜（11），硝酸纤维素膜（11）上有一条试验线（14）和一条多克隆抗体控制线（15），底板一端端头为吸水板（10），另一端端头为样品吸液层（13），硝酸纤维素膜（11）两端分别与吸水板（10）和单克隆抗体金标垫（12）相互交叠连接，在单克隆抗体金标垫（12）上压有样品吸液层（13），标签（6）贴于吸水板（10）端。
4. 根据权利要求1所述的一种针对氨基甲酸酯类农药多残留检测的胶体金快速检测装置，其特征在于胶体金试纸的样品吸液层由三层材料叠加组成，依次为10~25g/m<sup>2</sup>无纺布层、玻璃纤维层、10~25g/m<sup>2</sup>无纺布层，上述物质均需经过表面活性剂缓冲液浸泡处理，干燥后备用，上述装置除有毛细管作用原理外，还有虹吸作用原理，大大加快吸水移动速度。
5. 根据权利要求1所述的一种蔬菜中氨基甲酸酯类农药多残留的快速检测方法，其特征在于试纸的样品吸液层暴露于板身之外，当板身和板盖通过卡扣方式连接上时，样品吸液层被封闭在板盖之内，胶体金试纸的硝酸纤维素膜与板身的结果显示窗对应。
6. 根据权利要求1所述的一种针对氨基甲酸酯类农药多残留检测的胶体金快速检测装置，其特征在于胶体金试纸利用胶体金竞争法原理制成，试验线由氨基甲酸酯类农药合成免疫原包被，金标垫由氨基甲酸酯类农药筛选出的单克隆抗体标记，控制线是由羊抗鼠多克隆抗体包被制成，可以根据调节金标垫和试验线包被物的成分，每种试纸根据GB2763-2005中华人民共和国国家标准食品中农药最大残留限量制定各自的最高残留限量值，完成一次性检测多种氨基甲酸酯类农药。
7. 根据权利要求1所述的一种针对氨基甲酸酯类农药多残留检测的胶体金快速检测装置，其特征在于本发明所涉及氨基甲酸酯类农药包括但不限于福美双、甲萘威、灭虫威、残杀威、速灭威。

## 针对氨基甲酸酯类农药多残留检测的胶体金快速检测装置

### 技术领域

本发明涉及一种针对氨基甲酸酯类农药多残留检测的胶体金快速检测装置，可对蔬菜及食品中氨基甲酸酯类农药残留物进行检测，属于农药快速检测领域。

### 背景技术

在世界人口急剧膨胀的今天，合理的使用农药可以提高粮食产量，但过量使用会造成严重的环境污染，并造成中毒及三致（致畸、致癌、致突变），严重影响人们的身体健康。氨基甲酸酯类农药有甲萘威、福美双、灭杀威、速灭威、残杀威等，它们选择性强、作用快，是当前我国使用量最大的杀虫剂之一，但它存于植物中残毒不易清除，接触此类农药就会使人中毒，且中毒快、猛、抢救不及时会造成死亡，近年来，由于氨基甲酸酯类农药在食品中残留超标而造成的中毒事件时有发生。因此，寻求一种快速、准确地检测农副产品中氨基甲酸酯类农药残留的方法迫在眉睫。

根据中华人民共和国的国家标准，并参考其他国家或地区的检测标准，检测氨基甲酸酯类农药残留的分析方法主要是液相色谱、气相色谱法（GC）或气相色谱与质谱（MS）联用法（GC/MS）。这些方法普遍存在着样品前处理过程复杂，灵敏度受样品的净化、浓缩等步骤的影响很大，耗时，检测设备昂贵，并要求有专业的技术人员及较长的分析周期。

国内农业部推荐酶抑制法作为氨基甲酸酯类农药多残留的快速检测方法，酶抑制法是利用氨基甲酸酯类农药可特异性地抑制昆虫中枢和周围神经系统中乙酰胆碱酯酶的活性，破坏神经的正常传导，使昆虫中毒致死这一毒理学原理，将乙酰胆碱酯酶与样品反应，仪器通过测定酶与底物、显色剂显色反应变色速率，并与空白对照比较求得酶抑制率，残留农药浓度越高，抑制率越高，从而判定农药残留量是否超标。目前，利用这一原理生产的各种快速检测仪、速测卡等已成为我国农药残留快速检测的主流技术。但是，酶抑制法只能作为定性的快速初筛检测法，原因是不同的氨基甲酸酯类农药有不同的最大残留限量值，设定一个抑制率作为标准，只能检测出样品中是否含有氨基甲酸酯类农药，而无法确定是某种氨基甲酸酯类农药，更不能根据各种氨基甲酸酯类农药最高残留限量检测出特定品种农药残留是否超标。如根据国标规定，克百威在甜菜中的最大残留限量为 0.1mg/kg，而甲萘威在蔬菜中最大残留限量为 2mg/kg，若按照 0.1mg/kg 的标准设定抑制率，其实样本中含有的是 <2mg/kg 的农药甲萘威，一概定性为农药超标，那么检出的是假阳性结果，反之，若按照 2mg/kg 的标准设定抑制率，其实样本中含有的是 >0.1mg/kg 的农药克百威，那么就会忽略克百威超标而造成漏检。因此，酶抑制法只是一种定性的检测法，不能进行定量、半定量检测。

为了降低检测成本、降低操作难度，在传统免疫检测法的基础上引入胶体金快速检测技术，应用免疫胶体金法检测氨基甲酸酯类农药残留，实现氨基甲酸酯类农药的半定量多残留检测方法，该方法具有快速、灵敏、操作简便、成本低、无需专业人员检测，真正达到复杂原理与简易操作的有机统一，同时具有保存方便，有效期长的特点。

## 发明内容

本发明针对上述问题，本发明提供了一种针对氨基甲酸酯类农药多残留检测的胶体金快速检测装置，可快速、方便、一次性针对一个样品检测出氨基甲酸酯类农药福美双、甲萘威、灭虫威、残杀威、速灭威。

解决以上技术难题所采用的技术方案是：

本发明由检测板和胶体金试纸两部分组成，根据专门针对每一种氨基甲酸酯类农药设计的半抗原，合成小分子人工免疫原，通过免疫筛选，得到灵敏度高、特异性强的单克隆抗体，利用胶体金层析法制得试纸，试纸通过工艺方法固定于检测板内部。

检测板包括板身和板盖两部分，检测板由硬度适中的材料制成，板身正面有结果显示窗、指示检测对象的标签、检测人员信息登记栏和结果判断说明，板身内部设置有与试纸条对应的凹槽，凹槽数量为5条以上，胶体金试纸数量与凹槽数量对应，板身和板盖通过卡扣方式连接。

胶体金试纸通过凹槽固定于板身内部，由底板、吸水板、标签、硝酸纤维素膜、单克隆抗体金标垫、样品吸液层、MAX线组成，底板中部为硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜上有一条试验线和一条多克隆抗体控制线，底板一端端头为吸水板，另一端端头为样品吸液层，硝酸纤维素膜两端分别与吸水板和单克隆抗体金标垫相互交叠连接，在单克隆抗体金标垫上压有样品吸液层。

胶体金试纸的样品吸液层由三层材料叠加组成，依次为10~25g/m<sup>2</sup>无纺布层、玻璃纤维层、10~25g/m<sup>2</sup>无纺布层，上述物质均需经过表面活性剂缓冲液浸泡处理，干燥后备用，上述装置除有毛细管作用原理外，还有虹吸作用原理，大大加快吸水移动速度。

试纸的样品吸液层暴露于板身之外，当板身和板盖通过卡扣方式连接上时，样品吸液层被封闭在板盖之内，胶体金试纸的硝酸纤维素膜与板身的结果显示窗对应。

胶体金试纸利用胶体金竞争法原理制成，试验线由氨基甲酸酯类农药合成免疫原包被，金标垫由氨基甲酸酯类农药筛选出的单克隆抗体标记，控制线是由羊抗鼠多克隆抗体包被制成，可以根据调节金标垫和试验线包被物的成分，完成一次性检测多种氨基甲酸酯类农药。

本发明所涉及氨基甲酸酯类农药包括但不限于包括福美双、甲萘威、灭虫威、残杀威、速灭威。

把本装置样品吸液层放入果汁、蔬菜浸汁中，由于毛细管作用样品将沿着试纸条吸水层端移动，当移动至单克隆抗体金标垫时，样品中的农药与单克隆抗体金标探针发生特异结合，当移动至固定有合成免疫原的试验线时，由于单克隆抗体金标垫中的抗体与样品中农药优先结合成复合物而失去其与农药合成免疫原结合的能力，因此其胶体金不能滞留于试验线上，试验线处没有红色线显示，即只有一条红色控制线为阳性；相反如果样品中没有农药，单克隆抗体金标垫中的抗体移动到试验线上，单克隆抗体就会与农药合成免疫原发生特异结合，使胶体金滞留于试验线上，即二条红色线为阴性。

制成试纸其检测农药设定检出量以上，观察窗处出现一条红线为阳性；设定检出量以下出现双红线为阴性；设定检出量时在试验线处为一条模糊阴影线为界限值，从而得出判断。

当移动至羊抗鼠多克隆抗体控制线时，无论样品中有无待检农药，标记的金标探针都会与已设定好的羊抗鼠多克隆抗体结合滞留，使控制线显示红色。因此控制线无色带产生则代表操作有误，检测时样品液面超过 MAX 线或试纸已经过期。

由于采用上述技术方案，本发明所提供的蔬菜中氨基甲酸酯类农药多残留的快速检测方法具有这样的有益效果，即方便快捷、可移动、一次性同时检测多种氨基甲酸酯类农药，且特异性强，灵敏度高，无须专门技术人员操作，而且结果易读。

## 附图说明

图 1 为本发明的外观图。

图 2 为本发明的剖视图。

图 3 为胶体金试纸的外观图。

图 4 为胶体金试纸的分解图。

图 5 为胶体金试纸的阳性结果图。

图 6 为胶体金试纸的阴性结果图。

1.检测板, 2.板身, 3.板盖, 4.信息登记栏, 5.结果判断说明, 6.标签, 7.结果显示窗, 8.胶体金试纸, 9.底板, 10.吸水板, 11.硝酸纤维素膜, 12.单克隆抗体金标垫, 13.样品吸液层 14.试验线, 15.控制线, 16.MAX 线, 17.凹槽。

## 具体实施方式

### 具体实施例 1：灭虫威单克隆抗体的制备

1. 灭虫威合成免疫原的制备：3-甲基-4-甲硫基苯酚 11mmol 溶于 30mLCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>，加入 1.16mL 吡啶和 2g 对硝基苯氯甲酸酯，冰浴，反应完全后得到中间体 1。300mg 中间体 1 溶于 9mL 四氢呋喃，0.12g 6-氨基己酸溶于碳酸氢钠溶液中，冰浴条件下，调节 pH 至 4 左右，萃取，旋转蒸除溶剂得到半抗原。活性酯法连接大分子蛋白（BSA），合成灭虫威免疫抗原。

2. 灭虫威单克隆抗体的制备：用合成的福美双免疫原免疫 6 周龄雌性 BALB/C 小鼠。用 SP2/0 细胞融合建立瘤株进行筛选，取瘤细胞注射于 BALB/c 小鼠腹腔，使其产生腹水。提取小鼠腹水纯化筛选，获得效价高特异性强甲萘威单克隆抗体。

### 具体实施例 2：福美双单克隆抗体的制备

1.福美双合成免疫原的制备：3.6g 氢氧化钠加入 4.6g 4-甲基氨基丁酸盐，滴加 16mL 二硫化碳溶液，萃取反应液，得到中间体 1。5g 中间体 1 溶于二甲基二硫代氨基甲酸钠溶液，加入 140mL 甲醇/二氯甲烷（15：5）溶液，旋转蒸除溶剂，得到半抗原。活性酯法连接大分子蛋白（BSA），合成福美双免疫抗原。

2. 福美双单克隆抗体的制备：用合成的福美双免疫原免疫 6 周龄雌性 BALB/C 小鼠。用

SP2/0 细胞融合建立瘤株进行筛选，取瘤细胞注射于 BALB/c 小鼠腹腔，使其产生腹水。提取小鼠腹水纯化筛选，获得效价高特异性强甲萘威单克隆抗体。

#### 具体实施例 3：速灭威单克隆抗体的制备

1. 速灭威合成免疫原的制备：4g 无水碳酸钾加入 50ml 乙腈，常温搅拌，加入 2g 间甲酚，并滴加 6-溴己酸乙酯 4g，加热反应，反应完全后过滤洗涤旋蒸反应液，得到淡黄色油状液体，此为中间体 1。1M 的 NaOH 溶液 60ml，加入中间体 1 中，搅拌反应。用乙酸乙酯洗涤反应液，将液体过滤旋蒸除去溶剂，得到淡黄色油状物，结晶后固体物即为半抗原。活性酯法连接大分子蛋白（BSA），合成速灭威免疫原。

2. 速灭威单克隆抗体的制备：用合成的福美双免疫原免疫 6 周龄雌性 BALB/C 小鼠。用 SP2/0 细胞融合建立瘤株进行筛选，取瘤细胞注射于 BALB/c 小鼠腹腔，使其产生腹水。提取小鼠腹水纯化筛选，获得效价高特异性强甲萘威单克隆抗体。

#### 具体实施例 4：残杀威单克隆抗体的制备

1. 残杀威合成免疫原的制备：取 4g 无水碳酸钾加入 50mL 乙腈，常温搅拌，加入 2g 2-异丙氧基苯酚及 3g 6-溴己酸乙酯，升温至回流，反应完毕后过滤，旋蒸得到棕色的油状液体，加入 60mL 1M 的氢氧化钠溶液，加热搅拌，反应完全后冷却得到透明黄色液体，此为中间体 1。酸化中间体 1，溶液逐渐变浑浊，萃取反应液，得到淡黄色液体，干燥萃取，旋蒸除去溶剂得到淡黄色固体，将固体用乙酸乙酯溶解加入正己烷进行重结晶。将结晶析出的固体滤出，凉干，得到半抗原。活性酯法连接大分子蛋白（BSA），合成残杀威免疫抗原。

2. 残杀威单克隆抗体的制备：用合成的福美双免疫原免疫 6 周龄雌性 BALB/C 小鼠。用 SP2/0 细胞融合建立瘤株进行筛选，取瘤细胞注射于 BALB/c 小鼠腹腔，使其产生腹水。提取小鼠腹水纯化筛选，获得效价高特异性强甲萘威单克隆抗体。

#### 具体实施例 5：甲萘威单克隆抗体的制备

1. 甲萘威合成免疫原的制备：将 2.88g  $\alpha$ -萘酚溶于 20mL 四氢呋喃中，加入 3g 琥珀酸酐和 4mL 三乙胺避光搅拌回流反应过夜。减压除溶剂，残留物用乙酸乙酯溶解，加入 20mL 蒸馏水。冷却到 4℃，搅拌下用 0.1mol/L HCl 调 pH 至 3~4。静置，分取酯相。水相用乙酸乙酯 10mL×3 萃取。合并酯相，无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥后，减压蒸除溶剂。用乙醚溶解得到的固体，过滤后重结晶。得到甲萘威半抗原。活性酯法连接大分子蛋白（BSA），合成甲萘威免疫抗原。

2. 甲萘威单克隆抗体的制备：用合成的福美双免疫原免疫 6 周龄雌性 BALB/C 小鼠。用 SP2/0 细胞融合建立瘤株进行筛选，取瘤细胞注射于 BALB/c 小鼠腹腔，使其产生腹水。提取小鼠腹水纯化筛选，获得效价高特异性强甲萘威单克隆抗体。

#### 具体实施例 6：胶体金的制备及与抗体结合：

取双蒸水加适量的氯金酸磁力搅拌加温到 85~95℃，加入适量柠檬酸三钠继续加热搅拌至沸腾 3~10 分钟，冷却后避光保存备用。把单克隆抗体标记的胶体金液，吸附纤维材料上，干燥后备用。

## 具体实施例 7

图 1 详细表示了本发明的外观图,从图中可以看出本发明由检测板(1)和胶体金试纸(8)两部分组成。

### (一) 检测板

由图 1 可见,检测板(1)包括板身(2)和板盖(3)两部分。板身正面有结果显示窗(7)和指示检测对象的标签(6),同时印刷有检测人员信息登记栏(4)和结果判断说明(5)。板身(2)内部设置有与试纸条对应的凹槽(17)。板身(2)和板盖(3)通过卡扣方式连接。

### (二) 胶体金快速检测试纸

图 4 为试纸的分解图,由图可见胶体金试纸(8)固定于板身(2)内部,是由底板(9)、吸水板(10)、标签(6)、硝酸纤维素膜(11)、单克隆抗体金标垫(12)、样品吸液层(13)、MAX 线(16)组成,底板(9)中部为硝酸纤维素膜(11),硝酸纤维素膜(11)上有一条试验线(14)和一条多克隆抗体控制线(15),底板一端端头为吸水板(10),另一端端头为样品吸液层(13),硝酸纤维素膜(11)两端分别与吸水板(10)和单克隆抗体金标垫(12)相互交叠连接,在单克隆抗体金标垫(12)上压有样品吸液层(13),标签(6)贴于吸水板(10)端。

制得甲萘威胶体金快速检测试纸、灭虫威胶体金快速检测试纸、残杀威胶体金快速检测试纸、速灭威胶体金快速检测试纸,同时固定于板身内。由此,本发明可一步完成对福美双、甲萘威、灭虫威、残杀威、速灭威的检测。

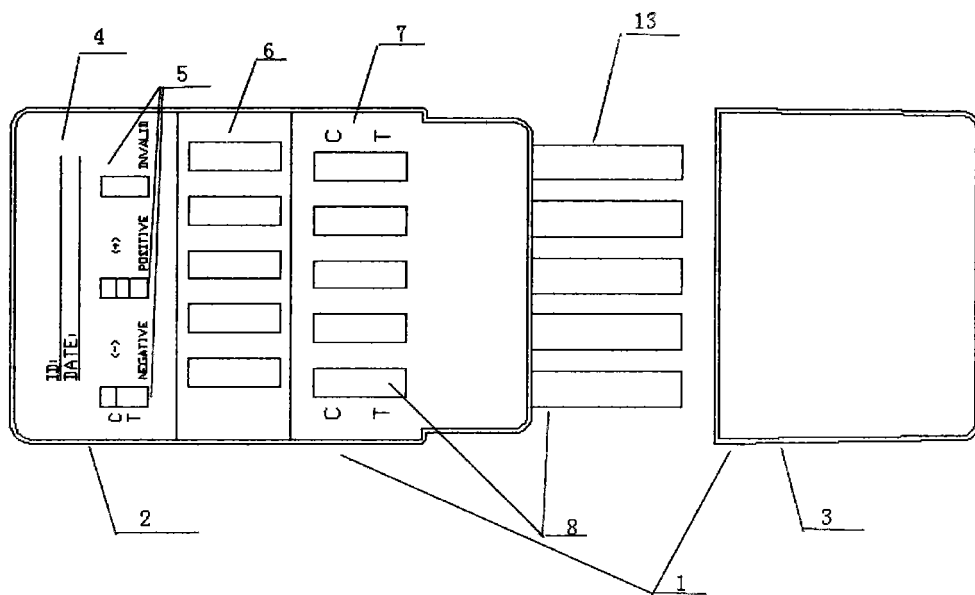


图 1

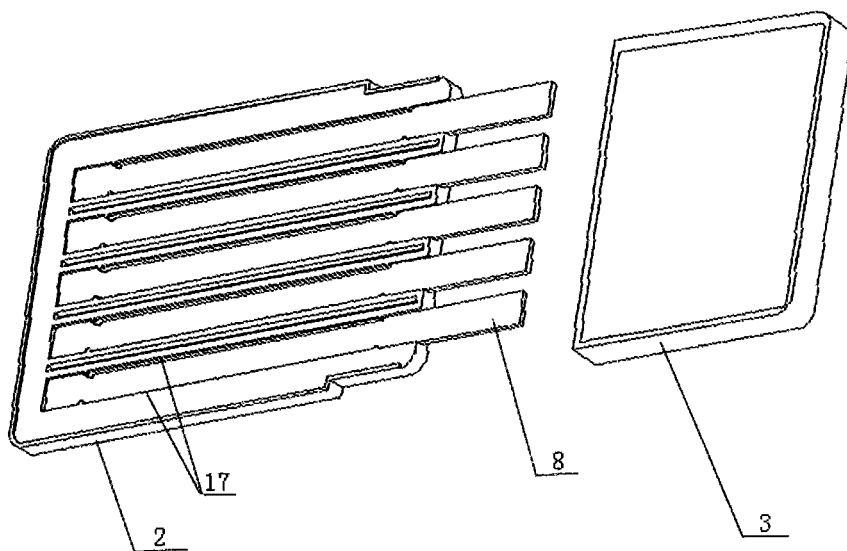


图 2

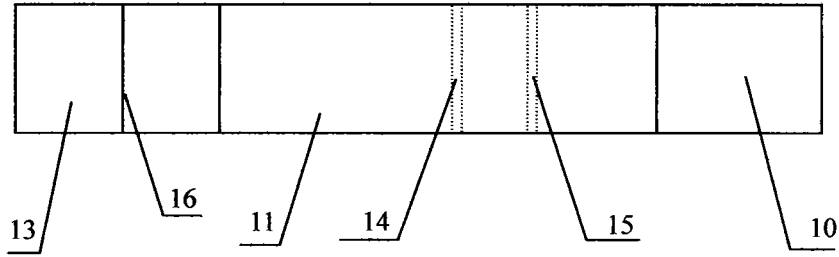


图 3

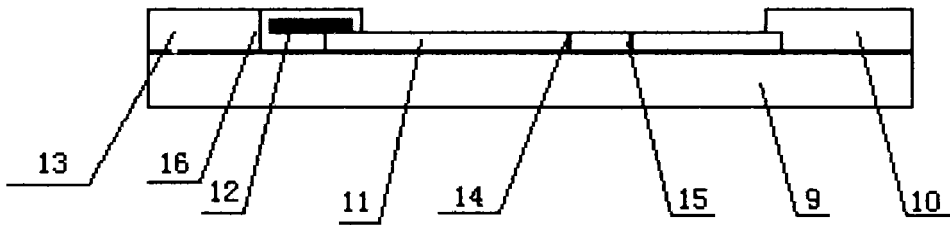


图 4

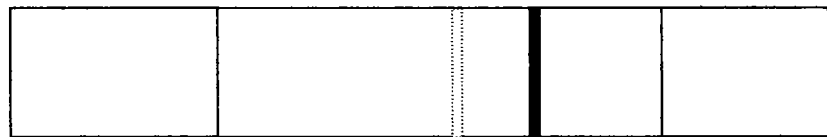


图 5



图 6

|         |  |         |            |
|---------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 针对氨基甲酸酯类农药多残留检测的胶体金快速检测装置                      |         |            |
| 公开(公告)号 | <a href="#">CN101661041A</a>                   | 公开(公告)日 | 2010-03-03 |
| 申请号     | CN200810119156.6                               | 申请日     | 2008-08-28 |
| [标]发明人  | 万积成  |         |            |
| 发明人     | 万积成  |         |            |
| IPC分类号  | G01N33/577 G01N33/558 G01N33/532               |         |            |
| 外部链接    | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明为一种针对氨基甲酸酯类农药多残留检测的胶体金快速检测装置，是由检测板和胶体金试纸两部分组成，根据专门针对每一种氨基甲酸酯类农药设计的半抗原，合成对应的氨基甲酸酯类农药小分子人工免疫原，通过免疫筛选，得到相应品种灵敏度高、特异性强的单克隆抗体，利用胶体金层析法制得不同氨基甲酸酯类农药品种的胶体金检测试纸，设置检测板内凹槽数量与试纸对应，试纸通过凹槽固定于检测板内部。本发明应用免疫胶体金法检测氨基甲酸酯类农药残留，实现氨基甲酸酯类农药的半定量多残留检测方法，该方法具有快速、灵敏、操作简便、成本低、无需专业人员检测，真正达到复杂原理与简易操作的有机统一，同时具有保存方便，有效期长的特点。

