

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 实用新型专利说明书

专利号 ZL 200520142531.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/557 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 1 月 31 日

[11] 授权公告号 CN 2864678Y

[22] 申请日 2005.12.7

[21] 申请号 200520142531.0

[73] 专利权人 万积成

地址 100088 北京市海淀区蓟门东里 2 号楼  
14-10

[72] 设计人 万积成

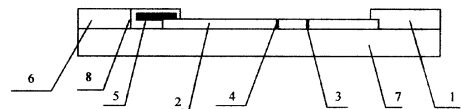
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

[54] 实用新型名称

快速检测毒死蜱残留的胶体金试纸

[57] 摘要

一种快速检测毒死蜱残留的胶体金试纸，由底板、吸水板、硝酸纤维素膜、单克隆抗体金标垫、样品吸液层组成。底板中部为硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜上有毒死蜱合成免疫原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，通过胶体金免疫竞争方法制成试纸，利用免疫胶体金法来检测果蔬中的毒死蜱残留量是否超标。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. 一种快速检测毒死蜱残留的胶体金试纸，其特征在于是由底板（7）、吸水板（1）、硝酸纤维素膜（2）、毒死蜱单克隆抗体金标垫（5）、样品吸液层（6）、MAX 线（8）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（4）和一条多克隆抗体控制线（3），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。
2. 根据权利要求1所述的一种快速检测毒死蜱残留的胶体金试纸，其特征在于控制线是由羊抗鼠多克隆抗体包被制成。
3. 根据权利要求1所述的一种快速检测毒死蜱残留的胶体金试纸，其特征在于试验线是由毒死蜱合成免疫原包被制成。
4. 根据权利要求1所述一种快速检测毒死蜱残留的胶体金试纸，其特征在于试验线的检测值设定为最低检出量范围为毒死蜱 0.05~5mg/kg。

## 快速检测毒死蜱残留的胶体金试纸

### 技术领域

本发明涉及一种用于果蔬及原粮类食品中农药残留检测试纸及其检测方法，属胶体金免疫检测领域。

### 背景技术

由于蔬菜生长期短且病虫害较为严重，因而，在蔬菜种植过程中常常需要连续多次施药。现在化蔬菜种植中用除草剂除草代替人工除草，提高劳动效率。而不少蔬菜需要多次采收，采收与施药的时间间隔短，造成采收时蔬菜中的农药残留量往往较高，很容易超过国家规定的标准。而蔬菜中农药残留量超标会严重影响人类健康水平，已成为不容忽视的食品污染源。政府和各职能部门对食品的农药残留问题十分关注。但由于农药的毒性和害虫的抗药性形成一个恶性循环，因此全面彻底禁止高剧毒农药的使用将有一个较长的过程，即使是全面使用中、低毒农药，农药恶性中毒事件仍然发生。因此对分析检测的对象、种类、数量、范围、指标等诸多方面都提出了新的要求和更高标准。

毒死蜱(O-O-二乙基 O-3,5,6-三氯-2-吡啶基磷酸酯)，是1965年由Dow Chemical Company推广使用的一种高效有机磷杀虫剂，在世界范围内应用于粮食、蔬菜、水果及经济作物的害虫防治。其对哺乳动物呈中等毒性，但对非靶标水生生物毒性较高。而且，环境样品中发现毒死蜱残留的情况也日趋严重，这对人们的健康构成了潜在的威胁。其可以抑制胆碱酯酶活性。中毒症状有头痛、头晕、无力，视力模糊、恶心、呕吐、瞳孔缩小、肌肉震颤。重者出现肺水肿、昏迷。对眼和皮肤也有刺激性。由于其可能伤害儿童的神经系统，阻止大脑的发育，美国环境保护署(EPA)2000年6月8日宣布在2000年末停止毒死蜱在住宅(包括住宅草地和花园)、学校、托儿所、公园、医院、私人疗养所和购物中心住宅草地和花园内的使用。中华人民共和国卫生部和中国国家标准化管理委员会于2005年1月25日发布，2005年10月1日实施中华人民共和国国家标准食品中农药最大残留限量(GB 2763-2005)，本标准规定了农药毒死蜱在稻谷、小麦、韭菜、叶菜类蔬菜中的最大允许残留量为0.1mg/kg；在甘蓝类蔬菜、梨果类水果、柑橘类水果中的最大允许残留量为1mg/kg；在番茄中的最大允许残留量为0.5mg/kg；在茎类蔬菜、棉籽油中的最大允许残留量为0.05mg/kg。

目前，检测农药残留的分析方法主要是依靠、气相色谱法(GC)或气相色谱与质谱(MS)联用法(GC/MS)。“酶抑制率法+分光光度法”已被列为国家推荐标准(GB/T 5009.199-2003)。

该法快速、灵敏、操作简便且成本低廉，可实现快速初筛，但受检测范围和精度的限制。而气相色谱法（GC）可实现精度的定量分析但速度较慢，检测成本较高。总之，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。

因此，利用竞争法原理，在传统免疫检测法的基础上引入了胶体金快速检测技术，研制出毒死蜱胶体金竞争法检测试纸。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

本发明针对上述存在的一些问题，提供了一种适用于检测毒死蜱是否超标的胶体金测定试纸。

为解决上述技术问题，本发明是通过以下技术方案实现的：

在毒死蜱残留检测试纸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羊抗鼠多克隆抗体控制线，在底板一端端头为吸水层，另一端端头为样品吸液层，硝酸纤维素膜两端分别与吸水层和毒死蜱单克隆抗体金标垫相互交叠连接（交叠连接部分在1—2毫米范围），在毒死蜱单克隆抗体金标垫上压有样品吸液层。关于底板、硝酸纤维素膜、吸水纸、胶体金标垫的组合方法按专利 CN 2741052Y 执行。

毒死蜱残留检测试纸的控制线是由羊抗鼠多克隆抗体包被而成，试验线是由毒死蜱合成免疫原包被。把检测毒死蜱残留的胶体金试纸的样品吸液层端放入果汁、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，当移动至毒死蜱单克隆抗体金标垫时，样品中的毒死蜱与毒死蜱单克隆抗体金标探针发生特异结合，当移动至固定有毒死蜱合成免疫原试验线时，由于毒死蜱单克隆抗体金标垫中的抗体与样品中毒死蜱优先结合成复合物而失去其与毒死蜱合成免疫原结合，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毒死蜱，毒死蜱单克隆抗体金标垫中的抗体移动到试验线上，毒死蜱单克隆抗体就会与毒死蜱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，这就是免疫竞争法原理。试验线的颜色深浅与样品中毒死蜱含量高低成反比。从阳性过渡到阴性，由于所测毒死蜱含量不同，试验线的颜色也不同，形成一个红色颜色梯度差，以这种原理检测出 OD 值，从而推断出试验线所反应实际毒死蜱的量。

用竞争法制成试纸其检测毒死蜱设定检出量以上，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，无论样品中有无毒死蜱，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，本发明所提供的一种快速检测毒死蜱残留的胶体金试纸具有这样的有益效果，即特异性强，灵敏度高，易储存，无须专门技术人员操作，而且结果易读。

#### 附图说明

图 1 为本发明一种快速检测毒死蜱残留的胶体金试纸的主视结构图。

图 2 为发明图一的侧视结构图。

图 3 为检测显示阳性结果图。

图 4 为检测显示阴性结果图。

图中 1、吸水板，2、硝酸纤维素膜，3、羊抗鼠多克隆抗体控制线，4、试验线，5、单克隆抗体金标垫，6、样品吸液层，7、底板，8、MAX 线。

#### 具体实施例

1. 根据毒死蜱的分子结构，推断其分子中的抗原决定区，选用毒死蜱农药原药经化学反应合成一种与毒死蜱分子结构相近的且具有羧基或氨基等易于蛋白质大分子相连接基团的分子结构（半抗原）。在缩合剂作用下使半抗原小分子与蛋白质大分子相连接制得毒死蜱免疫抗原。

#### 2. 单克隆抗体的制备

(1) 用合成的免疫原免疫 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。

(2) 提取小鼠腹水纯化筛选，获得能与毒死蜱分子结合的单克隆抗体用于胶体金标记。

#### 3. 胶体金的制备及与毒死蜱单克隆抗体的结合

(1) 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。

(2) 把毒死蜱单克隆抗体标记的胶体金液，吸附纤维材料上，干燥后备用。

4. 制膜机制膜：利用电脑控制传动速度，保证每单位膜上包被的抗体量相等。
5. 试纸条组合：见说明书附图，方法同专利 CN 2741052Y。
6. 使用方法：把试纸的样品吸液层端放入果汁、蔬菜浸汁中（液面不得超过 MAX 线图中 8），1 分钟后取出试纸平放，由于毛细管和虹吸作用样品将沿着试纸条吸水层端移动，5 分钟时观察结果。
7. 结果判断：检测毒死蜱浓度 0.5mg/kg 以上，观察窗处出现一条红线为阳性；0.5mg/kg 以下出现双红线为阴性；0.5mg/kg 时在试验线处为一条模糊阴影线为界限值，此界限值为国家颁布的蔬菜农药残留检测标准 0.5mg/kg。从而得出判断。

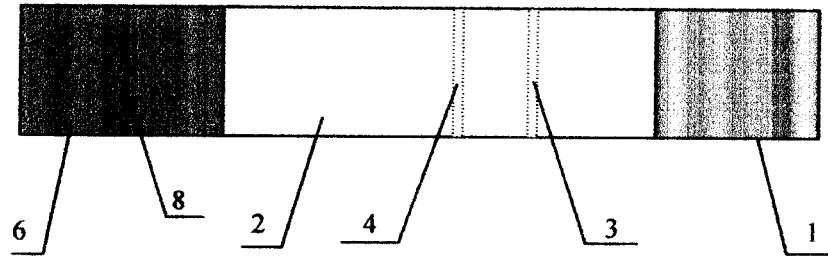


图 1

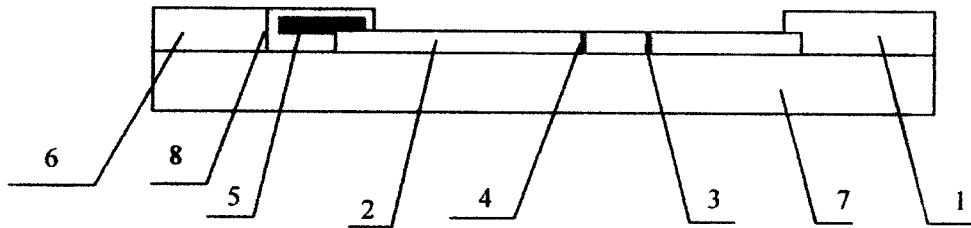


图 2

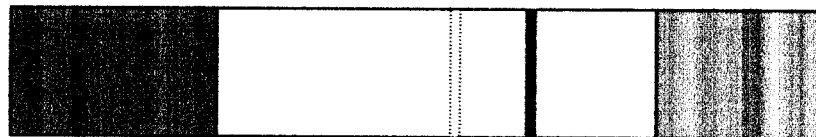


图 3

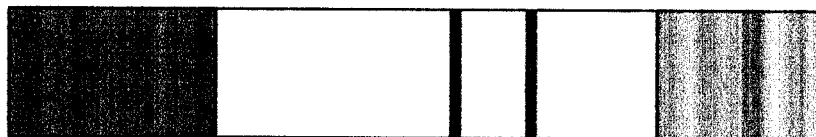


图 4

专利名称(译)	快速检测毒死蜱残留的胶体金试纸		
公开(公告)号	<a href="#">CN2864678Y</a>	公开(公告)日	2007-01-31
申请号	CN200520142531.0	申请日	2005-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	万积成		
申请(专利权)人(译)	万积成		
当前申请(专利权)人(译)	万积成		
[标]发明人	万积成		
发明人	万积成		
IPC分类号	G01N33/557 G01N33/544 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种快速检测毒死蜱残留的胶体金试纸，由底板、吸水板、硝酸纤维素膜、单克隆抗体金标垫、样品吸液层组成。底板中部为硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜上有毒死蜱合成免疫原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，通过胶体金免疫竞争方法制成试纸，利用免疫胶体金法来检测果蔬中的毒死蜱残留量是否超标。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。

