



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106674351 A

(43)申请公布日 2017.05.17

(21)申请号 201611267698.9

(22)申请日 2016.12.31

(71)申请人 沈阳金诚科技有限公司

地址 110866 辽宁省沈阳市东陵区东陵路  
185号

(72)发明人 马列 纪明山 魏松红 闫恕  
姜震

(74)专利代理机构 沈阳科威专利代理有限责任  
公司 21101

代理人 张述学

(51)Int.Cl.

*C07K 16/44*(2006.01)

*C07K 16/06*(2006.01)

*G01N 33/53*(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种检测苯醚甲环唑残留的ELISA检测试剂盒及检测方法

(57)摘要

本发明公开一种检测苯醚甲环唑残留的ELISA检测试剂盒及检测方法,利用氯乙烷将苯醚甲环唑分子结构中苯环上3位氢原子取代为乙基,并将其氧化为羧基,随后,利用混合酸酐法将半抗原连接至载体上形成人工抗体,载体为牛血清蛋白,利用苯醚甲环唑人工抗原免疫新西兰大白兔制备抗体,并与苯醚甲环唑标准品、浓缩洗涤液、底物显色液、反应终止液等相关试剂组成ELISA检测试剂盒。检测主要步骤包括:样品前处理、试剂盒检测、检测结果分析。与目前的几种应用较为广泛的常规检测方法相比,本发明涉及的酶联免疫检测方法具有成本低、检测灵敏度高等优点,为苯醚甲环唑的残留检测提供了有效的方法。

1. 一种苯醚甲环唑多克隆抗体的制备方法,其特征是:

(1) 苯醚甲环唑半抗原制备:

无水氯化铝与20 % 硝基苯放置于反应容器内,并将反应温度控制在10 °C,加入氯乙烷,之后滴加苯醚甲环唑悬浮剂,滴完后匀速搅拌,并于10 °C放置至反应完全;将反应物置于液体氟化氢溶液中,使其完全反应,室温放置2h,使氟化氢蒸发完全,反应结束后纯化产物;

取高锰酸钾溶于反应液中,升温,取上述纯化产物加入反应容器内,升温并搅拌直至紫色消失;对苯醚甲环唑半抗原产物进行重结晶,得到纯净物质,即苯醚甲环唑半抗原;

(2) 苯醚甲环唑人工抗原制备:

将苯醚甲环唑半抗原,溶于DMF中,均匀搅拌,加入三正丁胺,冰浴,加氯甲酸异丁酯,搅拌;取BSA,溶于0.1 mol/L柠檬酸盐缓冲液中;将半抗原、DMF混合溶液逐滴加入BSA溶液中,4 °C下搅拌离心后,弃掉沉淀,上清液透析72 h,期间更换透析液,干燥后得到苯醚甲环唑人工抗原;

(3) 将苯醚甲环唑人工抗原对小型哺乳动物进行免疫,所得到的多克隆抗体即为苯醚甲环唑多克隆抗体。

2. 一种检测苯醚甲环唑的ELISA检测试剂盒,其特征是:检测试剂盒内包括包被有苯醚甲环唑包被抗原的酶标板、苯醚甲环唑标准品、苯醚甲环唑抗体、浓缩洗涤液、酶标物、底物显色液和反应终止液。

3. 根据权利要求2所述的检测苯醚甲环唑的ELISA检测试剂盒,其特征是:酶标物为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体。

4. 根据权利要求2所述的检测苯醚甲环唑的ELISA检测试剂盒,其特征是:洗涤液:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  68.8 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  6.9 g,  $\text{NaCl}$  45 g;

底物显色液:底物液A:无水乙酸钠8.2 g,  $\beta$ -糊精2.5 g,过氧化氢脲428.6 mg;底物液B:100 mg TMB,10 mL DMSO;

反应终止液:1.25 mol/L的 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 。

5. 一种利用权利要求2或3或4所述ELISA检测试剂盒进行ELISA检测方法,其特征是步骤如下:

(1) 样品前处理:称取果蔬中可食用部分10 g放入研钵中,加入取10 mL提取液,充分研磨并过滤,所得滤液经处理后即为待测样品;

(2) 在包被有苯醚甲环唑抗原并封闭好的酶标板孔中,加入相同体积的苯醚甲环唑抗体及待测样品,37 °C孵育40 min后用洗涤液洗涤,静置5min,甩掉洗液,将酶标板拍干,洗涤3次;

(3) 加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体0.1 mL,37 °C孵育40min后用洗涤液,静置5min,甩掉洗液,将酶标板拍干,洗涤3次;

(4) 加入新鲜配制的底酶标板物显色液,每孔0.1 mL,37 °C反应30min,观察颜色变化;

(5) 待显色反应结束后,加入终止液,每孔0.05 mL,终止反应;

(6) 将酶标板置于酶标仪中,于490 nm波长处测定检测结果。

## 一种检测苯醚甲环唑残留的ELISA检测试剂盒及检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于蔬菜水果农药残留检测技术,更具体地说,是一种利用酶联免疫分析技术检测水果盒蔬菜中苯醚甲环唑的残留。

### 技术背景

[0002] 苯醚甲环唑(difenoconazole)是一种三唑类杀菌剂,其具有化学性质稳定、毒性较低以及广谱抗菌性等特点,其内吸性较强,可通过叶、根等部位吸收入至农作物体内,并运输至病害部位以发挥其杀菌作用,对多种果蔬中出现的炭疽病、叶枯病、黑腐病、白粉病等常见病症均具有很好的防治效果,尤其对蔬菜的叶斑病以及梨的黑星病有很好的防治作用,此外,还可对农作物起到刺激其生长的作用,提高果蔬的产量和品质。苯醚甲环唑虽因对真菌感染所引起的农作物病害具有良好的防治效果成为国内外较为普遍使用的杀菌剂,但随着其使用量逐年增加,其在果蔬中的残留问题越发受到人们的关注。我国强制性国家标准规定水果和蔬菜中苯醚甲环唑的最高残留量为2mg/kg(橄榄)和2 mg/kg(叶用莴苣、球形莴苣),此外,加拿大、美国等国家均对我国出口的果蔬中苯醚甲环唑的残留量制定了严格的标准。

[0003] 目前检测苯醚甲环唑的技术手段主要有气相色谱-串联质谱、液相色谱-串联质谱、气相色谱、负化学离子源质谱法等,但这些方法都存在回收率低、检测样品前处理程序繁琐等缺点,不适用于大量样品的检测工作。因此,迫切需要一种方便快捷的新型检测方法对果蔬中苯醚甲环唑的残留进行检测。酶联免疫法(ELISA)是目前应用较为广泛的一种检测分析方法,其基本原理是酶分子与抗体或抗原发生特异性结合,而这种结合不会改变抗体或抗原的免疫学特性,同时对酶的生物学活性也没有影响,因此大大提高了这种检测方法的准确性。目前仍未见到利用酶联免疫方法检测苯醚甲环唑残留的报道。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种检测苯醚甲环唑残留的ELISA检测试剂盒及检测方法,该试剂盒具有高灵敏度、高特异性等优点,可高效、快速检测果蔬中的苯醚甲环唑残留。

[0005] 本发明提供一种苯醚甲环唑多克隆抗体的制备方法,其特征是:

#### (1) 苯醚甲环唑半抗原制备:

无水氯化铝与20% 硝基苯放置于反应容器内,并将反应温度控制在10℃,加入氯乙烷,之后滴加苯醚甲环唑悬浮剂,滴完后匀速搅拌,并于10℃放置至反应完全;将反应物置于液体氟化氢溶液中,使其完全反应,室温放置2h,使氟化氢蒸发完全,反应结束后纯化产物;

取高锰酸钾溶于反应液中,升温,取上述纯化产物加入反应容器内,升温并搅拌直至紫色消失;对苯醚甲环唑半抗原产物进行重结晶,得到纯净物质,即苯醚甲环唑半抗原;

#### (2) 苯醚甲环唑人工抗原制备:

将苯醚甲环唑半抗原,溶于DMF中,均匀搅拌,加入三正丁胺,冰浴,加氯甲酸异丁酯,搅

拌;取BSA,溶于0.1 mol/L柠檬酸盐缓冲液中;将半抗原、DMF混合溶液逐滴加入BSA溶液中,4 °C下搅拌离心后,弃掉沉淀,上清液透析72 h,期间更换透析液,干燥后得到苯醚甲环唑人工抗原;

(3)将苯醚甲环唑人工抗原对小型哺乳动物进行免疫,所得到的多克隆抗体即为苯醚甲环唑多克隆抗体。

[0006] 本发明提供了一种检测苯醚甲环唑的ELISA检测试剂盒,其特征是:检测试剂盒内包括包被有苯醚甲环唑包被抗原的酶标板、苯醚甲环唑标准品、苯醚甲环唑抗体、浓缩洗涤液、酶标物、底物显色液和反应终止液。

[0007] 上述的酶标物为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体。

[0008] 上述的洗涤液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  68.8 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  6.9 g, $\text{NaCl}$  45 g;

底物显色液:底物液A:无水乙酸钠8.2 g, $\beta$ -糊精2.5 g,过氧化氢脲428.6 mg;底物液B:100 mg TMB,10 mL DMSO;

反应终止液:1.25 mol/L的 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 。

[0009] 本发明提供了一种利用ELISA检测试剂盒进行ELISA检测方法,其特征是步骤如下:

(1)样品前处理:称取果蔬中可食用部分10 g放入研钵中,加入取10 mL提取液,充分研磨并过滤,所得滤液经处理后即为待测样品;

(2)在包被有苯醚甲环唑抗原并封闭好的酶标板孔中,加入相同体积的苯醚甲环唑抗体及待测样品,37 °C孵育40 min后用洗涤液洗涤,静置5min,甩掉洗液,将酶标板拍干,洗涤3次;

(3)加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体0.1 mL,37 °C孵育40min后用洗涤液,静置5min,甩掉洗液,将酶标板拍干,洗涤3次;

(4)加入新鲜配制的底物液,每孔0.1 mL,37 °C反应30min,观察颜色变化;

(5)待显色反应结束后,加入终止液,每孔0.05 mL,终止反应;

(6)将酶标板置于酶标仪中,于490 nm波长处测定检测结果。

[0010] 本发明试剂盒的分析原理是:

将制备完成的苯醚甲环唑人工抗原包被于微孔板上,随后,人工抗原与载体蛋白相偶联,形成复合物,待测样品与苯醚甲环唑人工抗原相结合,然后与酶标二抗结合,形成“苯醚甲环唑人工抗原-苯醚甲环唑待测样品-酶标二抗”复合物,在加入底物液后,出现显色反应,观察显色结果。当待测样品中苯醚甲环唑浓度较低时,其显色反应较浅,OD值相对较低;反之,待测样品中苯醚甲环唑浓度较高时,其显色较深,酶标仪检测结果OD值较高。

[0011] 本发明的有益效果:能快速灵敏地检测果蔬中残留的苯醚甲环唑,样品前处理过程简单,处理时间少,并且方便同时检测大量样品,底本较低,可广泛应用于农业生产实践中的检测环节,为农作物中苯醚甲环唑残留的检测提供了简单可靠的方法。

## 具体实施方式

[0012] 以下将结合具体的实施例对本发明做进一步阐述,这些实施例仅用于说明本发明,但不限制本发明的范围。

[0013] 实施例1

### 苯醚甲环唑半抗原制备

将350 g无水氯化铝以及249.5 mL,浓度为20 % 的硝基苯溶液放置于装有搅拌器、回流冷凝管和分液漏斗的三颈瓶中,并将反应温度控制在10 °C,加入128.5 mL氯乙烷,之后缓慢滴入150 g 浓度为30 % 的苯醚甲环唑悬浮剂,滴加完后匀速搅拌,并于10 °C放置至氟化氢溶液中,反应2h使其反应完全后将氟化氢蒸发完全。反应结束后分出有机层,将溶剂DMF蒸发掉以纯化产物。称取20 g高锰酸钾溶于反应液中,将温度升至50 °C,取15 g上一步反应物加入反应容器内,全部加入后将温度升至65 °C,搅拌直至紫色消失。对苯醚甲环唑半抗原产物进行重结晶,得到纯净物质。

#### [0014] 实施例2

##### 苯醚甲环唑人工抗原制备

称取2 g苯醚甲环唑半抗原,溶于2 mL DMF中,均匀搅拌,加入30 $\mu$ L三正丁胺,冰浴,加30 $\mu$ L溶解于DMF的氯甲酸异丁酯,搅拌1h。称取3.2 g BSA,溶于5 mL,pH为 9.6,浓度为 0.1 mol/L的柠檬酸盐缓冲液中。将半抗原、DMF混合溶液逐滴加入BSA溶液中,4 °C下搅拌5 h,搅拌后将反应液在5000 r/min条件下离心30 min,弃掉沉淀,留取上清液,将上清液透析三天,透析期间每隔8 h更换一次透析液,最终得到苯醚甲环唑人工抗原。

#### [0015] 实施例3

##### 苯醚甲环唑抗体制备

取3 mg苯醚甲环唑人工抗原溶于1 mL生理盐水中,将稀释过后的苯醚甲环唑人工抗原与等体积的弗氏完全佐剂进行乳化,随后利用皮下多点注射方法将乳化后的苯醚甲环唑人工抗原注射于新西兰大白兔体内,每只大白兔一次用量为0.5 mg/kg。15天后,将同样用生理盐水稀释过的苯醚甲环唑人工抗原与等体积弗氏不完全佐剂进行乳化,加强免疫,剂量为0.01 mg/kg,15天后进行第三次使用稀释过苯醚甲环唑人工抗原与弗氏不完全佐剂乳化后进行加强免疫,从此次加强免疫开始,免疫7天后取血,并测定其抗血清效价,直到其效价达到一定数值,将制备好的多克隆抗体保存于-20 °C备用。

#### [0016] 实施例4

苯醚甲环唑酶联免疫吸附分析检测试剂盒,其包括以下组分:

- (1) 包被有苯醚甲环唑包被抗原的酶标板;
- (2) 苯醚甲环唑标准品;
- (3) 苯醚甲环唑抗体;
- (4) 辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体;
- (5) 洗涤液:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 68.8 g,NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.9 g,NaCl 45 g;
- (6) 底物液:底物液A:无水乙酸钠8.2 g, $\beta$ -糊精2.5 g,过氧化氢脲428.6 mg;加双蒸水至1000 mL,调节PH至5.0,4°C保存;底物液B:取100 mg TMB溶于10 mL DMSO中,棕色瓶保存。使用前取14.6 mL底物液A和0.45 mL底物液B混合15 min;
- (7) 反应终止液:1.25 mol/L的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;
- (8) 说明书一份。

#### [0017] 实施例5

##### 利用试剂盒检测苯醚甲环唑残留

- (1) 样品前处理:称取果蔬中可食用部分10 g放入研钵中,加入取10 mL提取液,充分研

磨并过滤,所得滤液经处理后即为待测样品。

[0018] (2)取0.1 mL待测样品和0.1 mL包被缓冲液加入孔内,并设置阳性对照(苯醚甲环唑标准品包被),37 °C包被40 min。洗涤,沥干,其中,用洗涤液洗涤3次,每次3 min。加入0.4 mL封闭液封闭30min,清洗后沥干。

[0019] (3)在包被有苯醚甲环唑抗原并封闭好的酶标板孔中,加入相同体积的苯醚甲环唑抗体及待测样品,37 °C孵育40 min后用洗涤液洗涤,静置5min,甩掉洗液,将酶标板拍干,洗涤3次。

[0020] (4)加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体0.1 mL,37 °C孵育40min后用洗涤液,静置5min,甩掉洗液,将酶标板拍干,洗涤3次。

[0021] (5)加入新鲜配制的底酶标板物显色液,每孔0.1 mL,37 °C反应30min,观察颜色变化。

[0022] (6)待显色反应结束后,加入终止液,每孔0.05 mL,终止反应。

[0023] (7)将酶标板置于酶标仪中,于490 nm波长处测定检测结果。

专利名称(译)	一种检测苯醚甲环唑残留的ELISA检测试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106674351A</a>	公开(公告)日	2017-05-17
申请号	CN201611267698.9	申请日	2016-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	沈阳金诚科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	沈阳金诚科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	沈阳金诚科技有限公司		
[标]发明人	马列 纪明山 魏松红 闫恕 姜震		
发明人	马列 纪明山 魏松红 闫恕 姜震		
IPC分类号	C07K16/44 C07K16/06 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/44 C07K16/06 G01N33/5308 G01N2430/00		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开一种检测苯醚甲环唑残留的ELISA检测试剂盒及检测方法，利用氯乙烷将苯醚甲环唑分子结构中苯环上3位氢原子取代为乙基，并将其氧化为羧基，随后，利用混合酸酐法将半抗原连接至载体上形成人工抗体，载体为牛血清蛋白，利用苯醚甲环唑人工抗原免疫新西兰大白兔制备抗体，并与苯醚甲环唑标准品、浓缩洗涤液、底物显色液、反应终止液等相关试剂组成ELISA检测试剂盒。检测主要步骤包括：样品前处理、试剂盒检测、检测结果分析。与目前的几种应用较为广泛的常规检测方法相比，本发明涉及的酶联免疫检测方法具有成本低、检测灵敏度高优点，为苯醚甲环唑的残留检测提供了有效的方法。