(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103018435 B
(45)授权公告日 2014.10.22

(21)申请号 201210237844.9

(22)申请日 2012.07.11

(83)生物保藏信息
CCTCC NO:201279 2012.07.10

(73)专利权人 南京农业大学
地址 210095 江苏省南京市卫岗1号南京农业大学植物保护学院刘凤权

(72)发明人 刘凤权 王利民 华修德

(51)Int.Cl.
G01N 33/531(2006.01)
G01N 33/558(2006.01)

审查员 李倩

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

有机磷农药多残留快速免疫金标试纸条及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及甲基对硫磷等8种有机磷农药的多残留快速检测金标试纸条。试纸条含有衬板、样品垫、金标结合垫、纤维素膜和吸水垫。金标结合垫为吸附金标抗体的玻璃纤维素膜;在纤维素膜上有甲基对硫磷偶联的载体蛋白溶液印制的直线式隐形检测线,用兔抗鼠IgG印制的直线式隐形对照线,两条线平行排列组合。本发明试纸条具有检测谱广、灵敏度高、快速、简便、直观、准确的特点,并且前处理简单,不需要任何仪器设备,无需专业人员操作。

CN 103018435 B

1. 一种有机磷农药多残留分析的快速检测试纸条，其特征在于：它包括纸板，纸板的一面从上到下依次黏贴吸水纸、检测垫、金标垫、样品垫，相邻各垫在连接处交叠连接；所述检测垫为硝酸纤维素膜，该膜自上而下设置质控线和检测线；所述质控线包被有兔抗鼠IgG；所述检测线包被有甲基对硫磷半抗原－鸡卵清白蛋白偶联物；所述金标垫喷涂有纳米金标记的抗多种有机磷农药的单克隆抗体，所述的单克隆抗体为由保藏编号为 CCTCC NO：C201279 的杂交瘤细胞株 C8/D3 分泌产生的单克隆抗体。

2. 权利要求 1 所述一种有机磷农药多残留分析的快速检测试纸条，其特征为：所述检测线包被的甲基对硫磷半抗原－鸡卵清白蛋白，是利用活泼酯法将半抗原 3- 甲基 -4- 硝基苯基 -O- 丁酸与鸡卵清白蛋白偶联的产物。

3. 根据权利要求 1 所述的单克隆抗体，其特征是：由保藏编号为 CCTCC NO：C201279 的杂交瘤细胞株 C8/D3 所分泌。

4. 产生权利要求 3 所述的分泌检测多种有机磷农药的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 C8/D3，于 2013 年 7 月 10 日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为 CCTCC NO：C201279。

有机磷农药多残留快速免疫金标试纸条及其制备方法

（一）技术领域

[0001] 本发明涉及农药残留免疫分析技术领域的一种快速检测器具，特别是涉及以纳米胶体金颗粒标记抗体的甲基对硫磷等 8 种有机磷农药胶体金快速检测试纸条。

（二）背景技术

[0002] 目前，农药残留检测中，仪器检测如气相色谱、高效液相色谱等仍是使用最为广泛的检测技术。然而，这一类传统的检测方法通常需要贵重的仪器设备，并只能在实验室环境中进行。于此相比，免疫检测技术因其简便、灵敏、经济而在农药残留检测领域中受到越来越多的关注。

[0003] 免疫检测方法通常分为单残留检测和多残留检测两种，多残留检测通过对检测农药总量的测定而实现多残留检测的目的。也就是说，当检测过程中受测样品中农药总量低于每个待检农药的残留标准，则表明受测样品是合格的。但传统的免疫检测方法，如酶联免疫吸附方法 (ELISA) 因其反应周期长而制约了其在现场快速检测中的应用。

[0004] 本发明的有机磷农药多残留胶体金试纸条，无需专业操作人员及任何辅助类仪器，根据反应所显现的条带几分钟即可判定结果，不仅操作简便、快速、结果直观准确、成本低，并且可以在室外进行检测。

（三）发明内容

[0005] 技术问题本发明的目的克服传统酶联免疫吸附检测技术的不足，研制出一种检测谱广、敏感、快速、简便的有机磷农药多残留快速检测试纸条。

[0006] 技术方案一种有机磷农药多残留快速检测试纸条，含有衬板和在衬板上一次衔接的样品垫、金标结合垫、纤维素膜和吸水垫。金标结合垫为吸附金标抗体的玻璃纤维棉，在纤维素膜上有用甲基对硫磷半抗原偶联的载体蛋白溶液印制的直线式隐形检测线，用免抗鼠 IgG 印制的直线式隐形对照线，两条线平行组合。

[0007] 所述的衬板为不吸水的韧性材料，用硬质塑胶条或不吸水硬纸条制成。

[0008] 所述的样品垫为玻璃纤维棉。

[0009] 所述的吸水垫为吸水能力较强的吸水滤纸或滤油纸。

[0010] 所述的纤维素膜为硝酸纤维素膜。

[0011] 所述的保护膜为不透明的胶膜，样品垫、金标结合垫对应的保护膜上印制有待测样品标记线，该标记线偏向样品垫一侧约 0.5 厘米处。

[0012] 所述的金标抗体为胶体金标记的以 O- 甲基 -O-(4- 硝基苯基)-N-(丁酸) 硫代磷酸酯为免疫半抗原免疫小鼠而获得的单克隆抗体，所述的偶联甲基对硫磷半抗原的载体蛋白为牛血清白蛋白，或为鸡卵清蛋白，或为人血清白蛋白。

[0013] 有益效果

[0014] 1. 检测谱宽，操作简便快速 ：本胶体金试纸条以胶体金标记识别多种农药通用结构的单克隆抗体为基础制备而成，金标抗体中的胶体金颗粒与抗体分子之间无共价键，两

者通过异性电荷间的范德华力相结合，胶体金的标记对单克隆抗体的识别范围和亲和力影响很小，且具有较高的标记率。并且在使用本胶体金试纸条时，无需任何其他辅助仪器，可现场操作，只要将检测样加入样品垫，在 10 分钟内即可判定检测结果。

[0015] 2. 结果显示形象、直观、准确：胶体金试纸条的检测结果以纤维素膜上的显色情况来判断。如果样品中有待测物时，待测物和金标抗体结合形成抗原－金标抗体复合物，并且继续上移，遇检测线不显色或显色很弱即表示检测样品阳性或弱阳性；如果样品中没有待测样品时，金标抗体继续上移，遇检测线显示一条清晰红线即表示检测样品阴性。对照线颜色的有无表示此试纸条有效或无效。结构判定形象、直观、准确、简单明了。

[0016] 3. 节省费用，使用范围广，便于推广。使用胶体金试纸条进行检测，比使用仪器和 ELISA 试剂盒检测的费用大幅降低；试纸条的使用范围广，可满足不同层次人员的需要，便于推广应用，具有广阔的市场前景和明显的经济和社会效益。

具体实施方式

[0017] 要制备识别甲基对硫磷等 8 种有机磷农药的快速检测试纸条，首先要制备通用半抗原与载体蛋白的偶联物，用于印制检测线，进而制备金标抗体，用于制备金标抗体纤维棉，其次要制备兔抗鼠 IgG 抗体，用于制备对照线。下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。

[0018] 实施例一：（制备实施例）

[0019] 1. 通用半抗原的合成

[0020] (1)O- 甲基 -O-(4- 硝基苯基)-N-(丁酸) 硫代磷酸酯的合成

[0021] 称取 4- 氨基丁酸 0.54g(约 5.2mmol)、KOH0.78g(约 11.4mmol)，溶解于 6mL 甲醇中，冰水浴冷却至 0-10℃，搅拌下缓慢加入溶解于 6mL 甲醇溶液的 (1)1.19g(约 4.2mmol)，保温反应 2h。反应完毕后，用石油醚 / 乙醚 (7 ： 1，体积比) 洗涤，水层调 pH ＝ 3.0 后用乙醚提取，无水硫酸钠干燥，蒸去溶剂，得浅黄色油状物 (H1)0.87g(产率为 60%)

[0022] (2)3- 甲基 4- 硝基苯基 -O- 丁酸的合成

[0023] 用 20mL DMF 溶解 2.89g(约 20mmol)3- 甲基 4- 硝基苯酚，与 8.3g(约 60mmol) K_2CO_3 一起放入三口反应瓶中，缓慢搅拌，将反应瓶置于油浴锅中；再将 4.28g(约 24mmol) 溴代丁酸乙酯缓慢加入。温度达到 100℃开始计时，保温反应 2-2.5h。反应结束后自然冷却，真空抽滤，旋干溶剂；再用乙酸乙酯溶解，水洗 2 次 (50mL/ 次)，无水 Na_2SO_4 干燥，旋干得中间产物 3- 甲基 4- 硝基苯基 -O- 丁酸乙酯。

[0024] 用 5mL 四氢呋喃溶解 3- 甲基 4- 硝基苯基 -O- 丁酸乙酯 5.6g(约 20mmol)，搅拌加入 50mLNaOH，回流反应 3h。水解反应结束后，调 pH ＝ 3.0 后用乙酸乙酯萃取三次，1mol/ $LNaHCO_3$ 萃取两次；再调 pH ＝ 3.0 后用乙酸乙酯萃取三次，无水 Na_2SO_4 干燥，旋干溶剂得棕色粉末状产物 3- 甲基 4- 硝基苯基 -O- 丁酸 3.11g(产率为 65.3%)。

[0025] 2. 半抗原与载体蛋白偶联

[0026] 利用活泼酯法 (Active Ester method，简称 AE 法) 将具有羧基末端 (-COOH) 的半抗原偶联到大分子蛋白质上。分别城区 0.1mmol 半抗原与 0.1mmolNHS，用 600ulDMF 溶解于反应装置中；称取 0.1mmolDCC，用 400ulDMF 溶解；将 DCC/DMF 溶液缓慢滴加到上述反应装置中。在磁力搅拌下室温密封反应 7 小时。反应终液置 4℃冰箱冷却 2 小时以上，经

8000rpm 离心 5 分钟，取上清活泼酯液十分缓慢的加入到 5ml15mg/ml 的 BSA 蛋白中，反应在磁力搅拌下室温搅拌 4 小时。待反应完成后，将反应液置于透析袋内，于 0.02mol/L pH6.8 的 PBS 缓冲液中 4℃搅拌透析，每四小时换一次透析液，共透析 60 小时。透析结束后将透析袋中的液体取出，经 4℃ 12000rpm 离心 5 分钟，取上清分装保存于 -20℃冰箱中。

[0027] 同法，用 OVA 或 HAS 代替 BSA 制备半抗原 - 载体蛋白。

[0028] 3. 单克隆抗体的制备

[0029] 以每只小鼠每次 50ug-100ug 免疫原量，免疫 5 周龄健康的雌性 BALB/C 小鼠。每次间隔时间 2-3 周，最后一次加强免疫后 3 天，在无菌条件下取出小鼠脾细胞。利用杂交瘤细胞技术奖小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 以 5 ∶ 1 的细胞数量比进行融合。融合后置于 37℃、5% CO2 培养箱中培养。通过细胞筛选、亚克隆等，建立能够分泌识别多种有机磷农药的杂交瘤细胞株。并将细胞株移入高密度细胞培养器 (CELLINE350) 中培养，收集细胞培养液并将抗体进行纯化，之后用超滤离心管去盐，冷冻抽干获得抗体干粉，并于 -20℃冻存备用。

[0030] 所获得的杂交瘤细胞株于 2012 年 7 月 10 日保藏于中国典型培养物保藏中心（中国，武汉，武汉大学），保藏编号 :CCTCC NO.201279，分类命名 :杂交瘤细胞株 C8/D3。

[0031] 4. 金标抗体和金标结合物垫的制备

[0032] 采用柠檬酸三钠还原氯金酸的方法，制备平均直径在 40nm 的胶体金悬浮液。在回流条件下，把 100ml0.01%的氯金酸溶液加热至沸腾，不停的搅拌，迅速加入 1.1ml1%的柠檬酸三钠。当反应溶液颜色变成葡萄红色时继续加热搅拌 5min。冷却至室温后，加入 0.05%的叠氮化钠 4℃保存。胶体金在于抗体标记前以 0.02mol 的 K2CO3 溶液调 pH 至 8.2 左右，采用经典 NaCl 滴定法确定胶体金溶液与抗体的最佳标记量为 110ug/ml。然后按最佳标记量进行标记，标记 1 小时后，搅拌下加入 10% BSA（使最终浓度为 1%），孵育 1 小时后 4℃ 10000rpm 离心 25min，并去上清。再用和所用胶体金溶液同体积的 2% BSA 溶液悬浮后 4℃ 10000rpm 离心 25min，重复两次。最后，用 1/5 胶体金同业体积的 TB 溶液（含 3% BSA、3%蔗糖、0.01mol/1 硼酸钠和 0.05%叠氮化钠）重悬，4℃保存。用 BioDot XYZ-3000 三维喷膜仪把 4%的 BSA 溶液以 8ul/cm 的量喷在玻璃棉上，使用干燥箱 42℃干燥。再把金标抗体以 7ul/cm 的量喷在玻璃棉上，干燥箱 42℃干燥，真空干燥保存。

[0033] 5. 偶联物和兔抗鼠 IgG 抗体纤维素膜的制备

[0034] 用 XYZ-3000 三维喷膜仪将一定浓度的偶联物和兔抗鼠 IgG 先后喷于纤维素膜的偏下侧和偏上侧，分别作为检测线和对照线，两线间隔 5mm。

[0035] 6. 快速试纸条的组装

[0036] 把纤维素膜粘贴在衬板中间部位上，吸水垫粘贴在纤维素膜上侧和纤维素膜重叠 1mm。

[0037] 金标结合物垫粘贴在 NC 膜下方，与纤维素膜重叠 1mm。样品垫粘贴在金标结合物垫下方重叠 2mm。组装好的试纸条用切条机切成 4.08mm 宽的试纸条。

[0038] 实施例二 :（应用实施例）

[0039] 1、检测样品液的制备

[0040] 1) 卷心菜样品液的制备

[0041] 待测样品用搅拌机匀浆，将已知浓度的甲基对硫磷、对硫磷和杀螟硫磷乙腈溶液

滴入10克匀浆样品中。样品充分混匀并在室温中静置1小时。将乙腈萃取液(总体积10ml)加入到上述样品中，混合液震荡1分钟，然后加入1.5克氯化钠和4克硫酸钠，并持续震荡3分钟。4000rpm离心5分钟，取1ml上清液并在40℃下用温和氮气吹干。干燥后样品用检测溶液溶解后进行试纸条检测。

[0042] (2)按照(1)中所描述的方法，依次将青菜和苹果进行样品前处理，获得检测样品液。

[0043] 2.检测及结果判断

[0044] 将金标试纸条样品端插入以上预处理的各待测样品液中，插入深度不得超过试纸条中MAX线。待测溶液通过虹吸作用带动待测物及金标结合物垫中的金标抗体一起向纤维素膜扩散，并最终渗入吸水垫端。在扩散过程中，如果样品中存在待测物质时，会阻止或减少金标抗体与纤维素膜上检测线的结合，使检测线不显色或显示为很弱的红色；如果样品中没有待测物或待测物浓度太小，不能阻止金标抗体与纤维素膜上检测线的结合，是检测线显示一条清晰红线即表示检测样品为阴性。同样，金标抗体也与纤维素膜上的对照线(兔抗鼠IgG)结合，使对照线显红色，而对照线的有无分别表示此试纸条的有效或无效。5-10分钟判定检测结果。

专利名称(译)	有机磷农药多残留快速免疫金标试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN103018435B	公开(公告)日	2014-10-22
申请号	CN201210237844.9	申请日	2012-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
[标]发明人	刘凤权 王利民 华修德		
发明人	刘凤权 王利民 华修德		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/558		
审查员(译)	李倩		
其他公开文献	CN103018435A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及甲基对硫磷等8种有机磷农药的多残留快速检测金标试纸条。试纸条含有衬板、样品垫、金标结合垫、纤维素膜和吸水垫。金标结合垫为吸附金标抗体的玻璃纤维素膜；在纤维素膜上有甲基对硫磷偶联的载体蛋白溶液印制的直线式隐形检测线，用兔抗鼠IgG印制的直线式隐形对照线，两条线平行排列组合。本发明试纸条具有检测谱广、灵敏度高、快速、简便、直观、准确的特点，并且前处理简单，不需要任何仪器设备，无需专业人员操作。