



## (12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 203178269 U

(45) 授权公告日 2013. 09. 04

(21) 申请号 201320177946. 6

(22) 申请日 2013. 04. 10

(73) 专利权人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信息  
产业基地高新四街 8 号

(72) 发明人 万宇平 聂雯莹 刘玉梅 蒲小容  
王建霞 贾芳芳 齐向武 杨学林

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

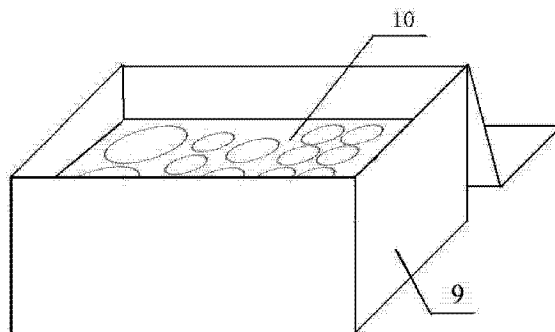
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

### (54) 实用新型名称

吡虫啉 ELISA 检测试剂盒

### (57) 摘要

本实用新型涉及一种检测吡虫啉的酶联免疫试剂盒。该试剂盒组成包括：96 孔酶标板、酶标二抗、抗体工作液、6 个浓度的标准品溶液、高浓度标准品、底物液 A 液、底物液 B 液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液。采用间接竞争 ELISA 方法，在酶标板微孔条上预包被偶联抗原，样本中的残留物吡虫啉和微孔条上预包被的偶联抗原竞争吡虫啉抗体，加入酶标二抗后，用底物液显色，样本吸光值与其所含残留物吡虫啉的含量成负相关，与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数，即可得出样品中吡虫啉的残留量。与仪器分析技术相比具有操作简便、费用低廉、灵敏度高等特点，可在吡虫啉的残留量检测中发挥重要作用。



1. 一种吡虫啉 ELISA 检测试剂盒,包括盒体和盒内的一块 96 孔的聚苯乙烯酶标板、一张盖板膜、14 瓶试剂和放试剂的下凹瓶位、一个自封袋,其特征在于:酶标板是采用 96 孔的聚苯乙烯试剂板作为固相载体,在试剂盒微孔条上预包被吡虫啉偶联抗原制成的检测板,14 瓶试剂分别为 6 瓶标准品溶液、高浓度标准品、酶标二抗、抗体工作液、底物液 A 液、底物液 B 液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液,下凹瓶位共 15 个。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:盒体是硬纸盒;96 孔的聚苯乙烯酶标板,放于真空铝箔袋内;盖板膜是塑料硬膜;标准品溶液用黑色帽的棕色玻璃瓶,高浓度标准品用蓝色帽的棕色玻璃瓶,酶标二抗用红色帽的白色 PE 塑料瓶,抗体工作液用绿色帽的白色 PE 塑料瓶,底物液 A 液用白色帽的白色 PE 塑料瓶,底物液 B 液用红色帽的黑色 PE 塑料瓶,终止液用黄色帽的白色 PE 塑料瓶,浓缩洗涤液用透明帽的半透明 PE 塑料瓶,浓缩复溶液用蓝色帽的半透明 PE 塑料瓶,下凹瓶位由塑料泡沫制成。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:酶标板是由外框支撑架及放置其上的可拆的 12 条酶标反应微孔条组成,每个可拆装酶标反应微孔条有 8 个反应孔;盖板膜大小与酶标板横切面大小一致;标准品溶液 6 瓶,1ml/瓶;高浓度标准品 1 瓶,1ml/瓶;酶标二抗 1 瓶,12ml;抗体工作液 1 瓶,7ml;底物液 A 液 1 瓶,7ml;底物液 B 液 1 瓶,7ml;终止液 1 瓶,7ml;浓缩洗涤液 1 瓶,40ml;浓缩复溶液 1 瓶,45ml。

## 吡虫啉 ELISA 检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本实用新型涉及一种检测吡虫啉的试剂盒,特别是检测吡虫啉的酶联免疫(ELISA)检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 吡虫啉(IMI)是烟碱类超高效杀虫剂,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、胃毒和内吸等多重作用。

[0003] 目前,含IMI的农药产品已在120多个国家的140余种农作物上登记使用,应用范围涉及粮食、经济、果树、茶叶和蔬菜等60余种作物,防治对象涉及同翅目、半翅目、缨翅目、双翅目、鞘翅目、鳞翅目等7个目50多种害虫。

[0004] IMI的大量使用不仅对环境造成了严重影响,同时畜禽因长期食用含IMI残留的植物,使其在体内富集,最后经食物链进入人体,危害人体健康。目前国内外已制订出多种农产品中IMI的最大残留限量标准(MRLs)。2008年欧盟重新审理和修正了IMI在近400种农产品中的MRLs,其中大部分谷物、水果、蔬菜中的MRL均为0.05 mg/kg。美国规定谷物、蔬菜中IMI的MRL为0.05 mg/kg,畜肉产品中IMI的MRL为0.3 mg/kg,家禽产品中为0.05 mg/kg。日本于2006年5月29日起执行的食品中农业化学品残留“肯定列表制度”(Positive List System)对畜、禽产品中IMI的MRLs的规定更为苛刻,其中不同动物的不同组织均有相应的MRLs,大部分肌肉组织中是0.02 mg/kg,肝脏中为0.05 mg/kg,脂肪中为0.3 mg/kg,对未制订MRLs的农用化学品,其在食品中的含量执行“一律标准”,即一律不能超过0.01 mg/kg。国内对农产品中IMI的MRL只有大致的规定,即在谷物、蔬菜中不超过0.5 mg/kg,从整体上看我国在食品中IMI的MRLs制定方面还落后于国外。

[0005] 从文献报道看,有关IMI残留的检测方法主要集中于高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱法(GC)、电化学分析法(EA)和免疫分析法(ELISA)四个方面,更倾向于色谱技术和免疫检测技术。尽管色谱法是目前公认的药物残留检测方法,但这类方法普遍存在着所需仪器昂贵、仪器操作技术要求高、样品前处理繁琐和分析耗时长、检测成本高、不适于现场实时检测等问题。而药物残留免疫检测技术在残留样本检测过程中的复杂程度、速度、灵敏度、准确性、特异性、单位时间内样本分析容量、检测成本等方面与仪器分析法的比较优势突出,几乎克服了仪器分析法所表现出来的所有不足,近年来已经在食品质量安全检测中得到了越来越广泛的应用,且逐渐被人们所认可。

[0006] 在对环境保护和农产品安全呼声日益提高的今天,农产品中农药残留的有效检测手段至关重要。随着国际上对IMI在农产品中MRLs的规定日益严格,为更好地适应进出口贸易和保护人民的健康,开发食品中IMI的残留快速检测技术势在必行。残留物的免疫学检测方法不仅检测限低、特异性强,而且操作简便、检测速度快、检测成本低,非常容易推广,是当前药物残留检测的研究热点。尽管国外已有IMI残留免疫学检测的文献报道,但均不同程度地存在着残留样本前处理程序复杂、费用高、检测限偏高,不能满足国际上IMI在食品中的MRLs等问题。因此,找到一个更有效的方法解决这些问题,是摆在我们面前亟待

解决的重要问题。

### 实用新型内容

[0007] 本实用新型所要解决的问题是提供一种小巧轻便的吡虫啉含量检测试剂盒,其操作简便,检测快速、准确、灵敏度高,成本低,稳定性好,需要的技术含量不高,可进行一次连续多个样品中吡虫啉含量的测定,减少了检测样本所需要的时间。

[0008] 本实用新型的技术方案是:一种吡虫啉 ELISA 检测试剂盒,包括盒体和盒内的一块 96 孔的聚苯乙烯酶标板、一张盖板膜、14 瓶试剂和放试剂的下凹瓶位、一个自封袋,其特征在于:酶标板是采用 96 孔的聚苯乙烯试剂板作为固相载体,在试剂盒微孔条上预包被吡虫啉偶联抗原制成的检测板,14 瓶试剂分别为 6 瓶标准品溶液、高浓度标准品、酶标二抗、抗体工作液、底物液 A 液、底物液 B 液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液,下凹瓶位共 15 个。

[0009] 标准品溶液用黑色帽的棕色玻璃瓶,高浓度标准品用蓝色帽的棕色玻璃瓶,酶标二抗用红色帽的白色 PE 塑料瓶,抗体工作液用绿色帽的白色 PE 塑料瓶,底物液 A 液用白色帽的白色 PE 塑料瓶,底物液 B 液用红色帽的黑色 PE 塑料瓶,终止液用黄色帽的白色 PE 塑料瓶,浓缩洗涤液用透明帽的半透明 PE 塑料瓶,浓缩复溶液用蓝色帽的半透明 PE 塑料瓶。

[0010] 酶标板由外框支撑架及放置其上的可拆的 12 条酶标反应微孔条组成,每个可拆装的酶标反应微孔条有 8 个反应孔,放入真空铝箔袋中,盒体为硬纸盒,下凹瓶位由塑料泡沫制成,以塑料硬膜为盖板膜,盖板膜大小与酶标板横切面大小一致,将 14 瓶试剂用不同大小、不同颜色的试剂瓶盛装并固定在下凹瓶位中,与酶标板、盖板膜、自封袋一同封装在硬纸盒内,以便于携带和运输。14 瓶试剂分别为 6 瓶 1ml 梯度浓度的标准品溶液、1ml 高浓度标准品、12ml 酶标二抗、7ml 抗体工作液、7ml 底物液 A 液、7ml 底物液 B 液、7ml 终止液、40ml 浓缩洗涤液、45ml 浓缩复溶液。每一个试剂盒中的试剂足够进行 96 次测定(包括标准分析孔),既可进行一次连续多个样品的检测,也可以将板孔拆开多次检测。将剩下的放回铝箔袋中用自封袋密封,这样可以保证试剂盒检测结果的准确性。检测时,样本中的吡虫啉将和酶标板微孔条上预包被的吡虫啉偶联抗原竞争抗吡虫啉的抗体,加入酶标二抗后,用底物液显色,样本吸光度值与所含吡虫啉的含量成负相关,与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数,即可得出样品中吡虫啉的含量,其操作简便易行。

[0011] 经实验表明本试剂盒具有很高的灵敏度:蔬菜、水果样本的最低检测限为 20 $\mu$ g/kg,回收率为 80%–120%。相对于其他吡虫啉检测方法,本试剂盒所需仪器较少,只需要酶标仪、涡旋仪、均质器、天平、离心机、玻璃试管、刻度移液管、洗耳球、聚苯乙烯离心管和微量移液器等,同类实验室一般均有配备,所需成本较低。

[0012] 本实用新型的有益效果是:能快速、简便、灵敏、准确地用于吡虫啉含量的检测。

### 附图说明

[0013] 图 1 为本实用新型酶标板的侧面纵剖面图(长为 8.55cm);

[0014] 图 2 为本实用新型酶标板的侧面横剖面图(长为 12.8cm);

[0015] 图 3 为本实用新型酶标板的俯视图;

[0016] 图 4 为本实用新型盖板膜平面图;

[0017] 图 5 为本实用新型试剂瓶纵剖面平面图;

[0018] 图 6 为本实用新型固定泡沫模具的俯视图；

[0019] 图 7 为本实用新型盒体与固定泡沫模具的侧视图。

## 具体实施方式

[0020] 一、吡虫啉 ELISA 检测试剂盒的组装

[0021] 酶标反应微孔条(2) 预包被吡虫啉偶联抗原(3) 固定于酶标板的外框支撑架(1) 上,酶标反应微孔条(2) 可随要求拆卸;盖板膜(4) 用于酶标板置水浴或恒温箱内反应时封盖酶标反应微孔条(2), 盖板膜大小与酶标板横切面大小一致;透明帽的半透明 PE 塑料试剂瓶(5) 用于封装 40ml 浓缩洗涤液;蓝色帽的半透明 PE 塑料试剂瓶(5) 用于封装 45ml 浓缩复溶液;白色帽的白色 PE 塑料试剂瓶(6) 用于封装 7ml 底物液 A 液,红色帽的黑色 PE 塑料试剂瓶(6) 用于封装 7ml 底物液 B 液,黄色帽的白色 PE 塑料试剂瓶(6) 用于封装 7ml 终止液,红色帽的白色 PE 塑料试剂瓶(7) 用于封装 12ml 酶标二抗,绿色帽的白色 PE 塑料试剂瓶(7) 用于封装 7ml 抗体工作液,黑色帽的棕色玻璃瓶(8) 用于封装 1ml/ 瓶的标准品溶液,蓝色帽的棕色玻璃瓶(8) 用于封装 1ml/ 瓶的高浓度标准品溶液;泡沫塑料模具(10) 有 15 个下凹瓶位,放置位置依次为:40ml 浓缩洗涤液瓶位(18),45ml 浓缩复溶液瓶位(11),7ml 底物液 A 液瓶位(14),7ml 底物液 B 液瓶位(13),7ml 终止液瓶位(12),7ml 抗体工作液瓶位(16),12ml 酶标二抗瓶位(15),6 个 1ml/ 瓶各种浓度的标准品溶液和 1 个 1ml/ 瓶高浓度标准品溶液瓶位(17),盒体(9) 是硬纸盒。

[0022] 二、样本的前处理

[0023] 蔬菜、水果样本前处理方法

[0024] 用均质器均质样本;称取  $2.0 \pm 0.05\text{g}$  均质物至 50ml 聚苯乙烯离心管中,分别加入 2ml 2M 氢氧化钠溶液,10ml 乙酸乙酯,用涡旋仪涡旋 5min,3000g 以上,室温(20-25℃)离心 5min;移取 1ml 上层有机相至 15ml 干净玻璃试管中,于(50-60℃)水浴氮气/空气流下吹干;加入 1ml 复溶工作液,涡动 3min;取  $50 \mu\text{l}$  用于分析。

[0025] 三、试剂盒的操作步骤

[0026] 1、将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温(20-25℃)平衡 30min 以上,注意每种液体试剂使用前均需摇匀。

[0027] 2、取出需要数量的微孔板,将不用的微孔板放入自封袋,保存于(2-8℃)。

[0028] 3、洗涤工作液在使用前也需回温。

[0029] 4、将样本和标准品工作液对应微孔按序编号,每个样本和标准品做 2 孔平行,并记录标准孔和样本孔所在的位置。

[0030] 5、加标准品/样本和抗体工作液:加标准品/样本  $50 \mu\text{l}$  到对应的微孔中,再加入抗体工作液  $50 \mu\text{l}$ /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25℃避光环境中反应 30min。

[0031] 6、洗板:小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液  $250 \mu\text{l}$ /孔,充分洗涤 4-5 次,每次间隔 10s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破)。

[0032] 7、加入酶标二抗  $100 \mu\text{l}$ /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25℃避光环境中反应 30min,取出重复洗板步骤 6。

[0033] 8、显色:加入底物液 A 液  $50 \mu\text{l}$ /孔,再加底物液 B 液  $50 \mu\text{l}$ /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25℃避光环境中显色 15min。

[0034] 9、测定：加入终止液 50  $\mu$ l/孔，轻轻振荡混匀，设定酶标仪于 450nm 处（建议用双波长 450/630nm 检测，请在 5min 内读完数据），测定每孔 OD 值。（若无酶标仪，则不加终止液用目测法可进行判定）。

[0035] 四、结果判定

[0036] 结果判定有两种方法，粗略判定可用第 1 种方法，定量判定用第 2 种方法。注意样本吸光度值与其所含吡虫啉的含量成负相关。

[0037] 1、用样本的平均吸光度值与标准吸光度值比较即可得出其浓度范围（ $\mu$ g/L）。假设样本 1 的吸光度值为 0.520，样本 2 的吸光度值为 1.210，标准液吸光度值分别是：0 $\mu$ g/L 为 1.984；4 $\mu$ g/L 为 1.582；12 $\mu$ g/L 为 1.132；36 $\mu$ g/L 为 0.690；108 $\mu$ g/L 为 0.380；324 $\mu$ g/L 为 0.119。则样本 1 的浓度范围是 36 $\mu$ g/L-108 $\mu$ g/L 再乘以其对应的稀释倍数即可得出样本中吡虫啉残留的浓度范围；样本 2 的浓度范围是 4  $\mu$ g/L-12 $\mu$ g/L，再乘以其对应的稀释倍数即可得出样本中吡虫啉残留的浓度范围。

[0038] 2、定量分析

[0039] （1）百分吸光率的计算，标准品或样本的百分吸光率等于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%，即：

[0040]

$$\text{百分吸光率 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

[0041] B—标准品或样本溶液的平均吸光度值

[0042]  $B_0$ —0 $\mu$ g/L 标准溶液的平均吸光度值

[0043] （2）标准曲线的绘制与计算

[0044] 以标准品百分吸光率为纵坐标，以吡虫啉标准品浓度（ $\mu$ g/L）的对数为横坐标，绘制标准曲线图。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的实际浓度。

[0045] 五、试剂盒中用到的材料制备方法

[0046] 1、抗原的制备

[0047] 半抗原制备

[0048] 100ml 二口瓶中加入吡虫啉 0.25g，1ml 的二甲基甲酰胺（DMF），水合氯化锡 0.75g 和 10ml 的乙醇，氮气排空，控温 65 $^{\circ}$ C 反应 40min，反应液显褐色，薄层色谱（TLC）检测反应完全。处理：降温至室温，加乙酸乙酯 50ml，加饱和碳酸氢钠水溶液调节至弱碱性，大量盐析出，乙酸乙酯 40ml  $\times$  2 次萃取浑浊液，合并有机相，盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，蒸干溶剂，得固体产物 0.22g。

[0049] 免疫原制备——吡虫啉与牛血清白蛋白（BSA）偶联得到免疫原。

[0050] 取 7mg 半抗原，溶解于 1ml DMF 中；取戊二醛水溶液 0.1ml 加入半抗原溶液中，室温下搅拌 24h，即可得到反应液 A；称取牛血清白蛋白（BSA）30mg，使之充分溶解在 2.7ml 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液（CB）（pH 9.6）中，将反应液 A 逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中，并于室温下搅拌 24h，用 5mol/L 的硼氢化钠水溶液 0.2ml 还原反应 4 小时，用 0.01mol/L 磷酸缓冲液（PBS）4 $^{\circ}$ C 透析 3d，每天换 3 次透析液，以除去未反应的小分子物质；分装，于 -20 $^{\circ}$ C 保

存备用。

[0051] 包被原制备——吡虫啉与卵清蛋白(OVA)偶联得到免疫原。

[0052] 取 7mg 半抗原,溶解于 1ml DMF 中;取戊二醛水溶液 0.1ml 加入半抗原溶液中,室温下搅拌 24h,即可得到反应液 A;称取 OVA 30mg,使之充分溶解在 2.7ml 0.1mol/L CB(pH 9.6)中,将反应液 A 逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌 24h,用 5M 的硼氢化钠水溶液 0.2ml 还原反应 4 小时,用 0.01mol/L PBS 4℃透析 3d,每天换 3 次透析液,以除去未反应的小分子物质;分装,于 -20℃保存备用。

[0053] 2、吡虫啉单克隆抗体的制备

[0054] 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 150 μg/只,使其产生抗血清。

[0055] 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。

[0056] 细胞冻存和复苏:将单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成  $1 \times 10^6$  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℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0057] 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  $5 \times 10^5$  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℃保存。

[0058] 3、羊抗鼠抗抗体的制备

[0059] 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。

[0060] 4、酶标记抗抗体的制备

[0061] 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。传统的过碘酸钠法要求反应体系中酶与抗体的摩尔浓度比为 4:1,由于辣根过氧化物酶在强氧化作用下产生许多与抗体结合的位点,这样活化的辣根过氧化物酶分子充当了连接各分子的桥梁,降低了酶标记物的酶活性,使制备的偶联物中混有许多聚合物。为了解决这个问题,我们将传统的方法进行了改良,即:

[0062] (1)省去了氨基的封闭过程,因为能产生自身氨基连接的氨基实际很少;

[0063] (2)降低辣根过氧化物酶与抗体的摩尔浓度比率至 2:1,改良后的方法比传统的方法简便,对酶活性的损失减少。

[0064] 5、酶标板的制备

[0065] 用包被缓冲液将包被原稀释成 20 μg/ml,每孔加入 100 μl,37℃避光孵育 2h,倾去孔中液体,用洗涤液洗涤 2 次,每次 30s,拍干,然后在每孔中加入 200 μl 封闭液,37℃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。

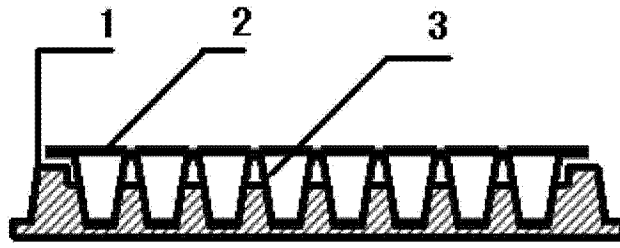


图 1

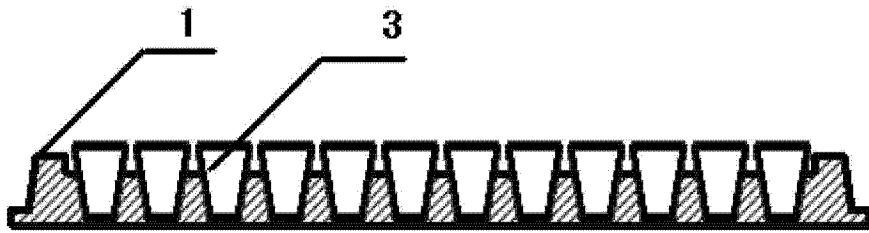


图 2

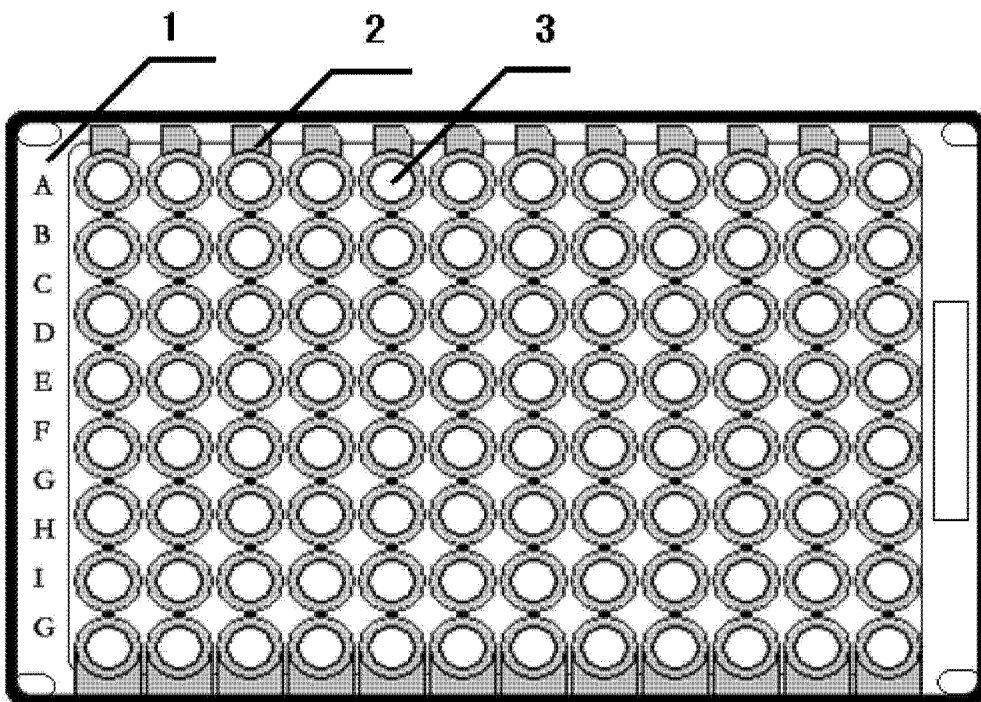


图 3

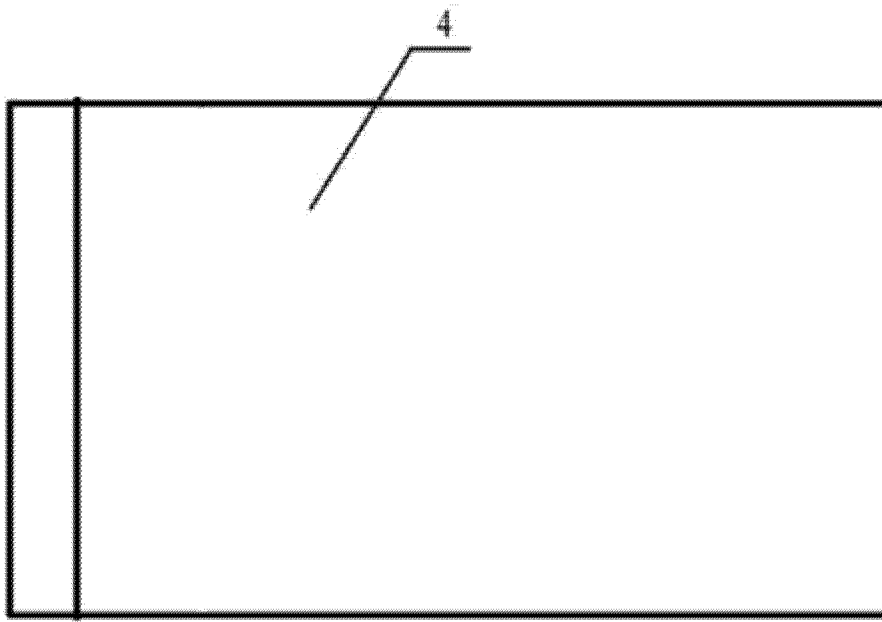


图 4

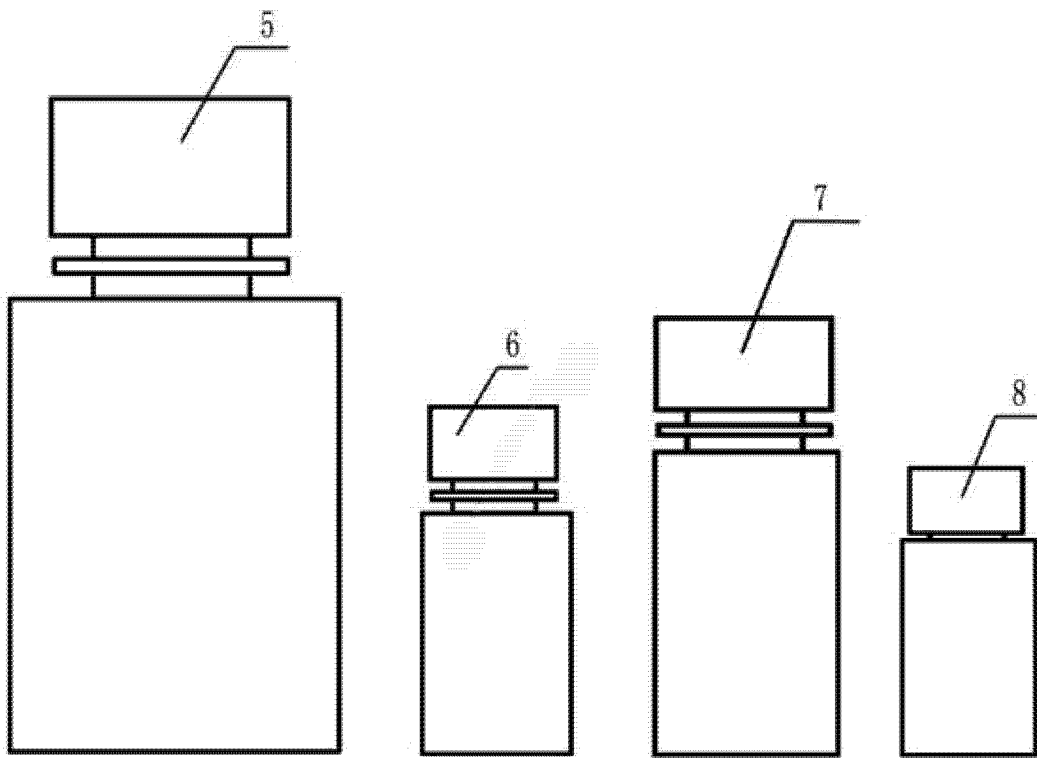


图 5

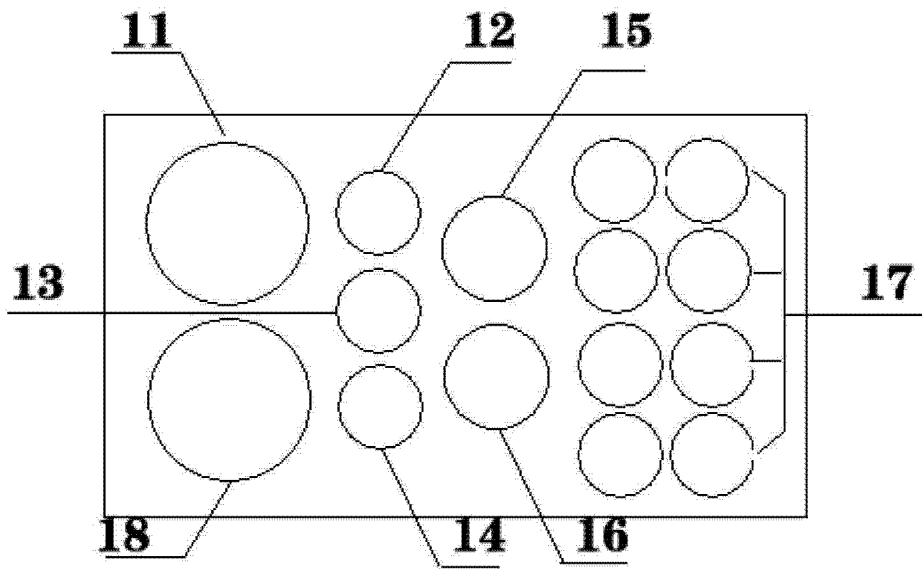


图 6

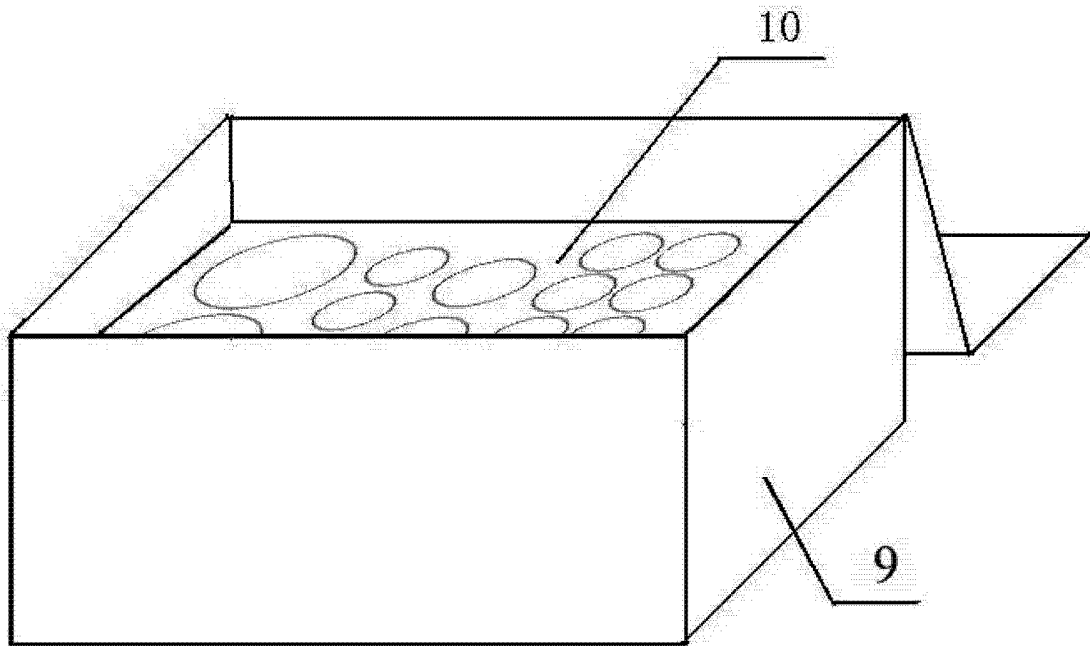


图 7

专利名称(译)	吡虫啉ELISA检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN203178269U</a>	公开(公告)日	2013-09-04
申请号	CN201320177946.6	申请日	2013-04-10
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	万宇平 聂雯莹 刘玉梅 蒲小容 王建霞 贾芳芳 齐向武 杨学林		
发明人	万宇平 聂雯莹 刘玉梅 蒲小容 王建霞 贾芳芳 齐向武 杨学林		
IPC分类号	G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本实用新型涉及一种检测吡虫啉的酶联免疫试剂盒。该试剂盒组成包括：96孔酶标板、酶标二抗、抗体工作液、6个浓度的标准品溶液、高浓度标准品、底物液A液、底物液B液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液。采用间接竞争ELISA方法，在酶标板微孔条上预包被偶联抗原，样本中的残留物吡虫啉和微孔条上预包被的偶联抗原竞争吡虫啉抗体，加入酶标二抗后，用底物液显色，样本吸光值与其所含残留物吡虫啉的含量成负相关，与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数，即可得出样品中吡虫啉的残留量。与仪器分析技术相比具有操作简便、费用低廉、灵敏度高等特点，可在吡虫啉的残留量检测中发挥重要作用。

