



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110196322 A

(43)申请公布日 2019. 09. 03

(21)申请号 201810160607.4

(22)申请日 2018.02.27

(71)申请人 广东志道医药科技有限公司

地址 528051 广东省佛山市禅城区张槎一
路127号1座3层P11

申请人 广州汉腾生物科技有限公司

(72)发明人 冯锐 王丁力 龙飞 方铁铮
杨凯

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

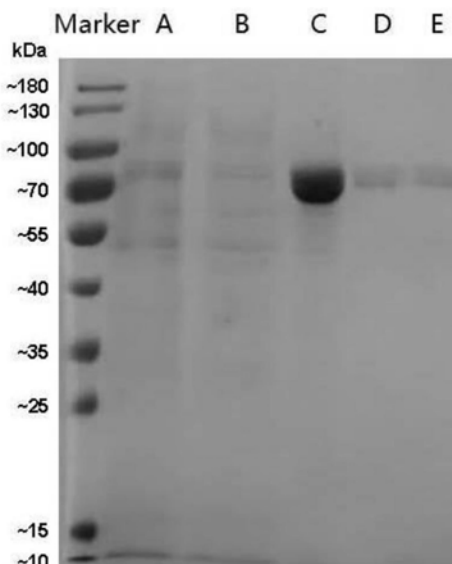
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测方法
及其试纸条和制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测方法,包括以下步骤:通过动物细胞进行重组人乙酰胆碱酯酶的表达,重组人乙酰胆碱酯酶纯化后用胶体金进行标记,农药完全抗原与农药小分子竞争性地与重组人乙酰胆碱酯酶结合;将胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶、农药完全抗原、重组人乙酰胆碱酯酶抗体等组装成试纸条;需要检测的样品经前处理后,用提取溶剂提取,得到样品溶液,将适量样品溶液滴加到样品垫上,样品溶液将会向吸水垫端移动,待3~15分钟后,根据检测线和控制线的显色情况,判断样品中是否含有有机磷类或氨基甲酸酯类农药残留。本发明可对大部分有机磷类和氨基甲酸酯类农药进行特异性识别,检测范围宽,灵敏度高。



1. 一种有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测方法,包括以下步骤:

(1) 通过动物细胞进行重组人乙酰胆碱酯酶的表达,重组人乙酰胆碱酯酶纯化后用胶体金进行标记,农药完全抗原与农药小分子竞争性地与重组人乙酰胆碱酯酶结合;

(2) 将胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶、农药完全抗原、重组人乙酰胆碱酯酶抗体等组装成有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测试纸条;所述试纸条由样品垫、金标垫、检测线、控制线、硝基纤维素膜、吸水垫、PVC底板组成;

(3) 需要检测的样品经前处理后,用提取溶剂提取,得到样品溶液,将适量样品溶液滴加到样品垫上,样品溶液将会向吸水垫端移动;

待3~15分钟后,根据检测线和控制线的显色情况,判断样品中是否含有有机磷类或氨基甲酸酯类农药残留,判断方法如下:

1) 检测线显红色,控制线显红色——阴性结果,样品中不含有有机磷类和氨基甲酸酯类农药;

2) 检测线不显红色,控制线显红色——阳性结果,样品中含有有机磷类或氨基甲酸酯类农药;

3) 无论检测线显不显红色,控制线不显红色——试纸条失效;

其中步骤(2)中,所述试纸条也可以将上述的金标垫去除,将胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶以固体或液体存放于容器中;

其中步骤(3)中,也可以将适量样品溶液滴加到重组人乙酰胆碱酯酶容器中,充分混合,将不含金标垫的试纸条插入容器中。

2. 根据权利要求书1所述的有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测方法,其特征在于:步骤(1)中,所述动物细胞为CHO-DG44。

3. 根据权利要求书1所述的有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测方法,其特征在于:步骤(1)中,所述重组人乙酰胆碱酯酶的表达的方法如下:根据人的乙酰胆碱酯酶的氨基酸序列,通过密码子优化、信号肽和标签修改等技术对基因加以适当改动,设计合成乙酰胆碱酯酶新的基因片段AChE,将新设计的AChE基因融合至哺乳动物细胞表达载体pMPT中,转染至CHO-DG44细胞中,经过筛选,得到稳定表达细胞池,此细胞能够生产和表达与天然人乙酰胆碱酯酶具有相同生物活性的重组人乙酰胆碱酯酶。

4. 根据权利要求书1所述的有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测方法,其特征在于:步骤(1)中,所述重组人乙酰胆碱酯酶的纯化,包括以下步骤:离心取细胞培养液上清,过滤除去不溶颗粒物后,以镍柱捕获其中的重组人乙酰胆碱酯酶,以含有梯度浓度咪唑的缓冲液洗脱结合在镍柱上的重组人乙酰胆碱酯酶,以透析或其他方法除去重组人乙酰胆碱酯酶溶液中的咪唑,将重组人乙酰胆碱酯酶溶液浓缩至所需浓度。

5. 根据权利要求书1所述的有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测方法,其特征在于:步骤(1)中,所述农药完全抗原由小分子半抗原与BSA或OVA偶联制得,其中小分子半抗原可以是修饰或未修饰的有机磷类农药小分子、修饰或未修饰的氨基甲酸酯类农药小分子、有机磷类农药通用半抗原、氨基甲酸酯类农药通用半抗原。

6. 根据权利要求书1所述的有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测方法,其特征在于:步骤(2)中,所述重组人乙酰胆碱酯酶抗体由上述重组人乙酰胆碱酯酶免疫鼠、兔、羊等动物制得。

7. 根据权利要求书1所述的有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测方法,其特征在于:步骤(3)中,所述提取溶剂为含0%~20%乙醇的pH为6~8的PBS缓冲液。

8. 一种由权利要求1~7任意一项所述有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测试纸条,其特征在于:所述试纸条由样品垫、金标垫、检测线、控制线、硝基纤维素膜、吸水垫、PVC底板组成,所述样品垫、金标垫、检测线、控制线、硝基纤维素膜、吸水垫均设置在PVC底板的上方,样品垫设置在PVC底板的边缘,金标垫与样品垫有部分重叠,金标垫和吸水垫分别与硝基纤维素膜两端部分重叠,硝基纤维素膜上靠近金标垫的一端喷涂有检测线,硝基纤维素膜靠近吸水垫的一端喷涂有控制线,金标垫上包被有胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶,检测线包被农药完全抗原,控制线上包被重组人乙酰胆碱酯酶抗体;所述试纸条也可以将上述的金标垫去除,将胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶以固体或液体存放于容器中。

9. 根据权利要求书8所述的有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测试纸条,其特征在于:所述样品垫和金标垫为玻璃纤维膜,所述吸水垫为滤纸。

10. 一种由权利要求8~9任意一项所述有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测试纸条的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1) 制备农药完全抗原:将农药半抗原与牛血清白蛋白(BSA)或卵清白蛋白(OVA),通过碳二亚胺法、活化酯法、混合酸酐法、重氮化法或戊二醛法等方法进行偶联,制备农药半抗原-BSA偶联物与农药半抗原-OVA偶联物,即农药完全抗原;

(2) 制备重组人乙酰胆碱酯酶:以CHO-DG44表达,以固定化金属离子亲和色谱(IMAC)对含有组氨酸标签的重组人乙酰胆碱酯酶进行纯化,SDS-PAGE纯度>90%;

(3) 制备胶体金:以柠檬酸三钠还原法制备胶体金,胶体金颗粒直径在20~60nm之间;

(4) 胶体金标记抗体:将胶体金溶液与重组人乙酰胆碱酯酶按1 μ g/mL~20 μ g/mL的比例混匀,通过离心纯化、浓缩,制备成胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶;

(5) 将胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶喷涂并固定在金标垫上,或将胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶以固体或液体形式保存于微孔等容器中,将农药完全抗原包被在检测线上,将重组人乙酰胆碱酯酶抗体包被在控制线上,并充分干燥;

(6) 将硝基纤维素膜、金标垫、样品垫、吸水垫依次粘合在PVC底板上,切成条状,即制成检测有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留的试纸条。

有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测方法及其试纸条和制备方法

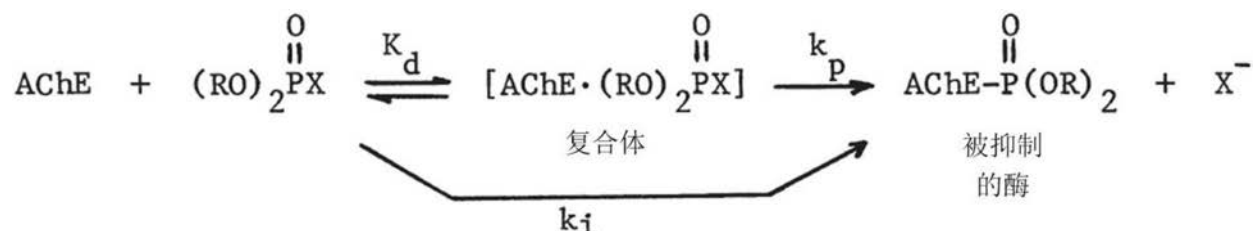
技术领域

[0001] 本发明涉及对农药残留的检测领域,具体涉及一种有机磷类农药和氨基甲酸酯类农药残留的检测方法及其试纸条和制备方法。

背景技术

[0002] 有机磷类农药和氨基甲酸酯类农药均为乙酰胆碱酯酶抑制剂,在人、哺乳动物和昆虫等体内,可以与乙酰胆碱酯酶不可逆的结合,抑制乙酰胆碱酯酶的活性,导致乙酰胆碱酯酶无法水解神经突出间隙内的乙酰胆碱,使乙酰胆碱持续刺激神经节,造成肌肉的强直收缩和衰竭等现象,即中毒现象的发生,有机磷类农药与乙酰胆碱酯酶结合的作用机制如下:

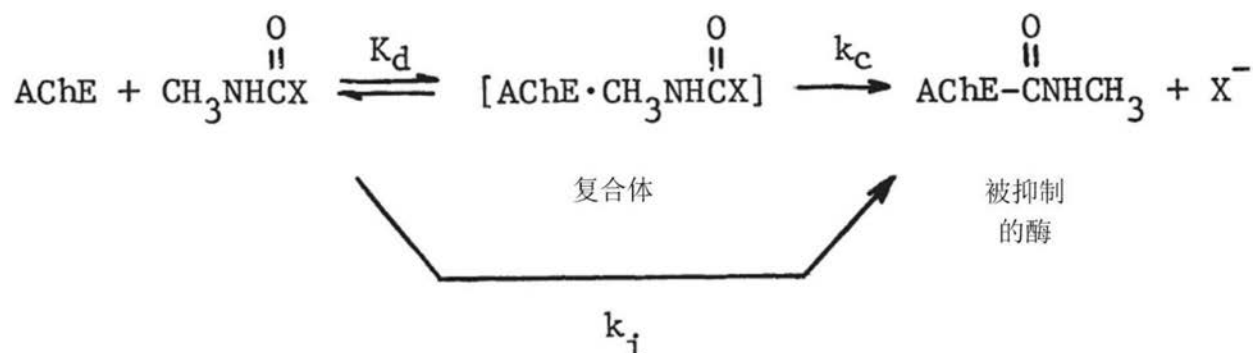
[0003]



[0004] 有机磷类农药与乙酰胆碱酯酶的结合包括两个阶段,结合阶段和磷酸化阶段,上图中 K_d 是反应物和复合体之间的解离常数, K_p 是磷酸化常数, K_i 是双分子抑制常数,它等于 K_p/K_d ,由于 K_d 是酶-抑制剂复合体离解程度的衡量,它与结合程度有关,并取决于抑制剂的分子结构和空间状态,磷酸化反应性能的改变则影响到磷酸化常数 K_p ,因此,抑制剂的立体效应、立体特异性、磷酸化反应性能、是否带正电荷等特征均会影响有机磷类农药对乙酰胆碱酯酶的抑制性能。

[0005] 氨基甲酸酯类农药与乙酰胆碱酯酶结合的作用机制如下:

[0006]



[0007] 氨基甲酸酯类农药与乙酰胆碱酯酶的结合同样包括两个阶段,结合阶段和氨基甲酰化阶段,上图中 K_d 是反应物和复合体之间的解离常数, K_c 是氨基甲酰化常数, K_i 是双分子抑制常数,它等于 K_p/K_c ,氨基甲酰化的酶并没有磷酸化的酶稳定,因此决定氨基甲酸酯类农

药抑制性能的主要是酶-氨基甲酸酯类农药复合体的结合性能,即与氨基甲酸酯类农药的空间结构、是否带有正电荷等特征油管。

[0008] 因此,结构不同的有机磷类农药和氨基甲酸酯类农药对乙酰胆碱酯酶的抑制能力均有一定的差别。

[0009] 目前,基于酶抑制法进行有机磷类农药和氨基甲酸酯类农药检的方法主要是GB/T 5009.199中的纸片法和酶抑制率法,但是其灵敏度和稳定性较差,尤其是所用的乙酰胆碱酯酶由动物体内提取,批间稳定性差异很大,无法达到准确的检测结果。

[0010] 利用胶体金免疫层析试纸条进行农药残留检测的产品目前也有出现,但是其主要针对某一种或几种农药的检测,实际运用中需要很多条试纸条同时进行检测,费时费力,而且也增加了成本。

发明内容

[0011] 本发明的目的是针对以上现有技术存在的缺陷,提供一种可同时检测有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留的简便准确的检测方法,可用于蔬菜、水果、粮食等产品中有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留的快速检测和初筛。

[0012] 为达到上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0013] 一种有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测方法,包括以下步骤:

[0014] (1)通过动物细胞进行重组人乙酰胆碱酯酶的表达,重组人乙酰胆碱酯酶纯化后用胶体金进行标记,农药完全抗原与农药小分子竞争性地与重组人乙酰胆碱酯酶结合;

[0015] (2)将胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶、农药完全抗原、重组人乙酰胆碱酯酶抗体等组装成试纸条;所述试纸条由样品垫、金标垫、检测线、控制线、硝基纤维素膜、吸水垫、PVC底板组成,所述样品垫、金标垫、检测线、控制线、硝基纤维素膜、吸水垫均设置在PVC底板的上方,样品垫设置在PVC底板的边缘,金标垫与样品垫有部分重叠,金标垫和吸水垫分别与硝基纤维素膜两端部分重叠,硝基纤维素膜上靠近金标垫的一端喷涂有检测线,靠近吸水垫的一端喷涂有控制线,样品垫和金标垫为玻璃纤维膜,金标垫上包被有胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶,检测线包被农药完全抗原,控制线上包被重组人乙酰胆碱酯酶抗体,吸水垫为滤纸;所述试纸条也可以将上述的金标垫去除,将胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶以固体或液体存放于容器中。

[0016] (3)需要检测的样品经前处理后,用提取溶剂提取,得到样品溶液,将适量样品溶液滴加到样品垫上,样品溶液将会向吸水垫端移动。

[0017] 步骤(3)中,也可以将适量样品溶液滴加到重组人乙酰胆碱酯酶容器中,充分混合,将不含金标垫的试纸条插入容器中。

[0018] 待3~15分钟后,根据检测线和控制线的显色情况,判断样品中是否含有有机磷类或氨基甲酸酯类农药残留,判断方法如下:

[0019] 1)检测线显红色,控制线显红色——阴性结果,样品中不含有有机磷类和氨基甲酸酯类农药;

[0020] 2)检测线不显红色,控制线显红色——阳性结果,样品中含有有机磷类或氨基甲酸酯类农药;

[0021] 3)无论检测线显不显红色,控制线不显红色——试纸条失效。

[0022] 进一步的,步骤(1)中,所述动物细胞为CHO-DG44;

[0023] 进一步的,步骤(1)中,所述重组人乙酰胆碱酯酶的表达的方法如下:根据人的乙酰胆碱酯酶的氨基酸序列,通过密码子优化、信号肽和标签修改等技术对基因加以适当改动,设计合成乙酰胆碱酯酶新的基因片段AChE,将新设计的AChE基因融合至哺乳动物细胞表达载体pMPT中,转染至CHO-DG44细胞中,经过筛选,得到稳定表达细胞池,此细胞能够生产和表达与天然人乙酰胆碱酯酶具有相同生物活性的重组人乙酰胆碱酯酶;

[0024] 进一步的,步骤(1)中,所述重组人乙酰胆碱酯酶的纯化,包括以下步骤:离心取细胞培养液上清,过滤除去不溶颗粒物后,以镍柱捕获其中的重组人乙酰胆碱酯酶,以含有梯度浓度咪唑的缓冲液洗脱结合在镍柱上的重组人乙酰胆碱酯酶,以透析或其他方法除去重组人乙酰胆碱酯酶溶液中的咪唑,将重组人乙酰胆碱酯酶溶液浓缩至所需浓度;

[0025] 进一步的,步骤(1)中,所述农药完全抗原由小分子半抗原与BSA或OVA偶联制得,其中小分子半抗原可以是修饰或未修饰的有机磷类农药小分子、修饰或未修饰的氨基甲酸酯类农药小分子、有机磷类农药通用半抗原、氨基甲酸酯类农药通用半抗原;

[0026] 进一步的,步骤(2)中,所述重组人乙酰胆碱酯酶抗体由上述重组人乙酰胆碱酯酶免疫鼠、兔、羊等动物制得;

[0027] 进一步的,步骤(3)中,所述提取溶剂为含0%~20%乙醇的pH为6~8的PBS缓冲液。

[0028] 本发明所述的检测有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留的试纸条的检测原理如下:

[0029] 滴加待测样品溶液后,样品溶液在各种膜的毛细作用下,沿着样品垫向吸水垫端移动,移动到金标垫时,样品溶液溶解胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶,或样品溶液与胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶溶液混合,当样品中含有待测物时,将与胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶发生不可逆结合并一起向吸水垫端移动,到达固定有农药完全抗原的检测线时,农药完全抗原将和待测物竞争结合胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶,样品中待测物含量越高,竞争越明显,检测线上的农药完全抗原与胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶结合越少,当农药完全抗原所结合的胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶少于一定数量时,检测线将不显红色,无论样品中含不含有待测物,过量的胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶或其与待测物结合物都会与控制线的重组人乙酰胆碱酯酶抗体结合,形成一条红色线,若控制线不显红色,则说明试纸条失效,需要重新更换试纸条进行检测。

[0030] 本发明所述有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测试纸条的制备,包括以下步骤:

[0031] (1) 制备农药完全抗原:将农药半抗原与牛血清白蛋白(BSA)或卵清白蛋白(OVA),通过碳二亚胺法、活化酯法、混合酸酐法、重氮化法或戊二醛法等方法进行偶联,制备农药半抗原-BSA偶联物与农药半抗原-OVA偶联物,即农药完全抗原;

[0032] (2) 制备重组人乙酰胆碱酯酶:以CHO-DG44表达,以固定化金属离子亲和色谱(IMAC)对含有组氨酸标签的重组人乙酰胆碱酯酶进行纯化,SDS-PAGE纯度>90%;

[0033] (3) 制备胶体金:以柠檬酸三钠还原法制备胶体金,胶体金颗粒直径在20~60nm之间;

[0034] (4) 胶体金标记抗体:将胶体金溶液与重组人乙酰胆碱酯酶按1 μ g/mL~20 μ g/mL的比例混匀,通过离心纯化、浓缩,制备成胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶;

[0035] (5) 将胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶喷涂并固定在金标垫上,或将胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶以固体或液体形式保存于微孔等容器中,将农药完全抗原包被在检测线上,将重组人乙酰胆碱酯酶抗体包被在控制线上,并充分干燥;

[0036] (6) 将硝基纤维素膜、金标垫(也可不需要金标垫)、样品垫、吸水垫依次粘合在PVC底板上,切成条状,即制成检测有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留的试纸条。

[0037] 本发明所述的检测有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留的试纸条具有以下优势:

[0038] (1) 本发明首次采用重组人乙酰胆碱酯酶以试纸条的形式测定农药残留,可对大部分有机磷类和氨基甲酸酯类农药进行特异性识别,检测范围宽,灵敏度高;

[0039] (2) 本发明以基因重组的方式合成乙酰胆碱酯酶,解决了目前市场上乙酰胆碱酯酶批间稳定性差异大的问题;

[0040] (3) 本发明试纸条的成本可控制在目前市场平均水平左右,且大大提高了检测稳定性和灵敏度,具有较高的推广和应用价值。

附图说明

[0041] 图1为本发明所述有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测试纸条的结构示意图;

[0042] 图2为本发明所述有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测试纸条的改进结构示意图;

[0043] 图3为本发明重组人乙酰胆碱酯酶纯化结果示意图。

[0044] 图中:1-PVC底板,2-样品垫,3-金标垫,4-检测线,5-控制线,6-硝基纤维素膜,7-吸水垫,8-胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶。

具体实施方式

[0045] 以下结合具体实施例进一步详细描述本发明的技术方案。

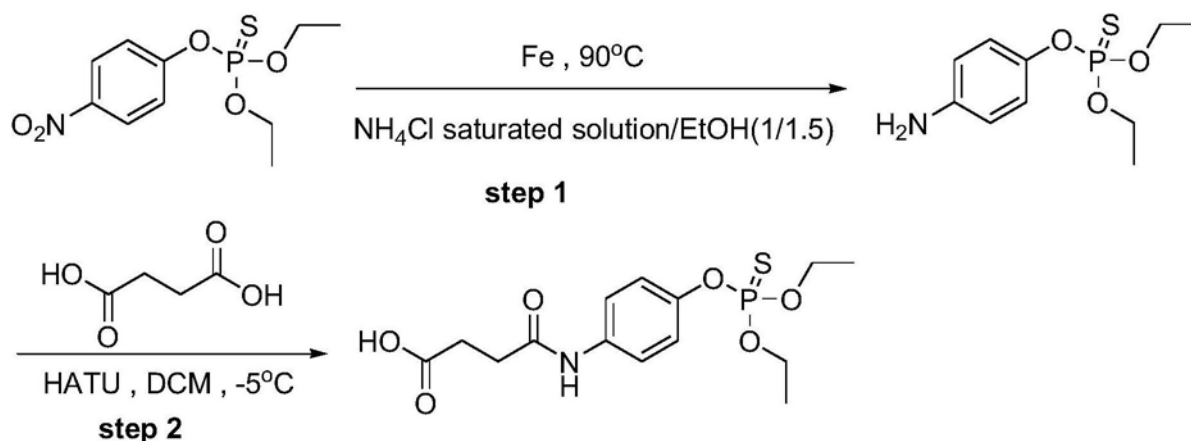
[0046] 如图1所示,一种有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测试纸条,由样品垫2、金标垫3、检测线4、控制线5、硝基纤维素膜6、吸水垫7、PVC底板1组成,所述样品垫2、金标垫3、检测线4、控制线5、硝基纤维素膜6、吸水垫7均设置在PVC底板1的上方,样品垫2设置在PVC底板1的边缘,金标垫3与样品垫2有部分重叠,金标垫3和吸水垫7分别与硝基纤维素膜6两端部分重叠,硝基纤维素膜6上靠近金标垫的一端喷涂有检测线4,硝基纤维素膜6靠近吸水垫7的一端喷涂有控制线5,样品垫2和金标垫3为玻璃纤维膜,金标垫3上包被有胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶8,检测线4包被农药完全抗原,控制线5上包被重组人乙酰胆碱酯酶抗体,吸水垫7为滤纸。

[0047] 作为本发明的进一步改进,如图2所示,所述试纸条也可以将上述的金标垫3去除,将胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶8以固体或液体存放于容器中。

[0048] 实施例1:农药半抗原的合成:

[0049] 以甲基对硫磷半抗原的制备为例,合成路径如下所示;

[0050]



[0051] 第一步:将4.53g对硫磷溶于150mL饱和氯化铵溶液/乙醇溶液中(体积比2:3),加入3.28g铁粉,90℃搅拌过夜。过滤,滤液减压浓缩至50mL。用乙酸乙酯萃取三次,每次50mL,合并萃取液,用无水硫酸钠除去其中的水分。水浴蒸干,残渣用柱色谱纯化(乙酸乙酯/石油醚,比例从1/50至1/2),得到氨基对硫磷。

[0052] 第二步:在-5℃条件下,将2.49mg琥珀酸溶于40mL二甲基甲酰胺中,加入260mL三氯乙烷,1.5mL三乙胺,4g多肽缩合剂HATU(2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯)以及1.83g氨基对硫磷。-5℃搅拌4小时,加入100mL水,用二氯甲烷萃取四次,每次80mL。合并萃取液,用饱和氯化钠溶液洗涤,然后用无水硫酸钠除去其中水分,过滤,减压浓缩。残渣用柱色谱纯化(乙酸乙酯/甲酸,比例10000/1),即得甲基对硫磷半抗原。

[0053] 实施例2:重组人乙酰胆碱酯酶的表达:

[0054] 本发明根据人的乙酰胆碱酯酶的氨基酸序列,通过密码子优化、信号肽和标签修改等技术对基因加以适当改动,设计合成乙酰胆碱酯酶新的基因片段AChE,以便基因与宿主细胞的融合和蛋白分泌表达,具体的新的基因片段AChE基因序列如下:

[0055] ATGGCGCCCGTCGCCGTCTGGGCCGCGCTGGCCGTCGACTGGAGCTCTGGGCTGCGGCGCACGCCCCGGGAGGATGCAGAGCTGCTGGTGACGGTGCGTGGGGGCCGGCTGCGGGGCATTGCGCTGAAGACCCCCGGGGGCCCTGTCTCTGCTTTCTGGGCATCCCCCTTTGCGGAGCCACCCATGGGACCCCGTCGCTTTCTGCCACCGAGCCCAAGCAGCCTTGCTCAGGGGTGGTAGACGCTACAACCTTCCAGAGTGTCTGCTACCAATATGTGGACACCCTATACCCAGGTTTTGAGGGCACCGAGATGTGGAACCCCAACCGTGAGCTGAGCGAGGACTGCCTGTACCTCAACGTGTGGACACCATACCCCCGGCCTACATCCCCACCCCTGTCCTCGTCTGGATCTATGGGGGTGGCTTCTACAGTGGGGCCTCCTCCTTGAGCTGTACGATGGCCGCTTCTTGGTACAGGCCGAGAGGACTGTGCTGGTGTCCATGAACCTACCGGGTGGGAGCCTTTGGCTTCCTGGCCCTGCGGGGAGCCGAGAGGCCCGGGCAATGTGGGTCTCCTGGATCAGAGGCTGGCCCTGCAGTGGGTGCAGGAGAACGTGGCAGCCTTCGGGGGTGACCCGACATCAGTGACGCTGTTTGGGGAGAGCGCGGGAGCCGCCTCGGTGGGCATGCACCTGCTGTCCCCGCCAGCCGGGGCCTGTTCCACAGGGCCGTGCTGCAGAGCGGTGCCCAATGGACCCTGGGCCACGGTGGGCATGGGAGAGGCCCGTCGCAGGGCCACGCAGCTGGCCACCTTGTGGGCTGTCCTCCAGGCGGCACTGGTGGGAATGACACAGAGCTGGTAGCCTGCCTTCGGACACGACCAGCGCAGGTCCTGGTGAACCACGAATGGCACGTGCTGCCTCAAGAAAGCGTCTTCCGGTTCTCCTTCGTGCCTGTGGTAGATGGAGACTTCCTCAGTGACACCAGAGGCCCTCATCAACGCGGGAGACTTCCACGGCTGCAGGTGCTGGTGGGTGTGGTGAAGGATGAGGGCTCGTATTTTCTGGTTTACGGGGCCCCAGGCTTCAGCAAAGACAACGAGTCTCTCATCAGCCGGGCCGAGTTCCTGGCCGGGGTGCGGGTTCGGGGTTCCCCAGGTAAGTGACCTGGCAGCCGAGGCTGTGGTCTGCATTACACAGACTGGCTGCATCCC

GAGGACCCGGCAGCCTGAGGGAGGCCCTGAGCGATGTGGTGGGCGACCACAATGTCGTGTGCCCCGTGGCCCAGCT
GGCTGGGCGACTGGCTGCCCAGGGTGCCCGGTCTACGCCTACGTCTTTGAACACCGTGCTTCCACGCTCTCCTGGC
CCCTGTGGATGGGGGTGCCCCACGGCTACGAGATCGAGTTCATCTTTGGGATCCCCCTGGACCCCTCTCGAACTAC
ACGGCAGAGGAGAAAATCTTCGCCCAGCGACTGATGCGATACTGGGCCAACTTTGCCCGCACAGGGGATCCCAATGA
GCCCCGAGACCCCAAGGCCCCACAATGGCCCCCGTACACGGCGGGGGCTCAGCAGTACGTTAGTCTGGACCTGCGGC
CGCTGGAGGTGCGGCGGGGGCTGCGCGCCAGGCCTGCGCCTTCTGGAACCGCTTCCTCCCCAAATTGCTCAGCGCC
ACCGACACGCTCGACGAGGCGGAGCGCCAGTGGAAGGCCGAGTTCCACCGCTGGAGCTCCTACATGGTGCCTGGAA
GAACCAGTTCGACCACTACAGCAAGCAGGATCGCTGCTCAGACCTGCACCACCACCACCACCCTGATAA

[0056] 将新设计的AChE基因片段融合至哺乳动物细胞表达载体pMPT中,转染至CHO-DG44细胞中,经过筛选,得到稳定表达细胞池。此细胞能够生产和表达与天然人乙酰胆碱酯酶具有相同生物活性的重组人乙酰胆碱酯酶。

[0057] 实施例3:重组人乙酰胆碱酯酶的纯化:

[0058] 350mL CHO细胞培养液上清,加入30mL 4.0mol/L NaCl,加入0.6mL Ni Bestarose FF,在2~8℃中缓慢混匀,孵育过夜,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗Ni Bestarose FF后,依次用含75mmol/L、100mmol/L、500mmol/L咪唑的PBS缓冲液清洗Ni Bestarose FF,用SDS-PAGE电泳检测洗脱组分中重组人乙酰胆碱酯酶的纯度,合并纯度>90%的组分,在PBS缓冲液中透析过夜后,用浓缩管浓缩至1.7mg/mL,如附图3所示,图中:

[0059] A:纯化前的细胞培养液上清;

[0060] B:与Ni Bestarose FF孵育过夜后的细胞培养液上清;

[0061] C:75mmol/L咪唑洗脱组分;

[0062] D:100mmol/L咪唑洗脱组分;

[0063] E:500mmol/L咪唑洗脱组分。

[0064] 实施例4:应用实施例:

[0065] 在市场上取蔬菜叶片,剪取适量,磨碎,加入含10%乙醇的pH=7的PBS缓冲溶液振荡提取,放置分层,吸取上清液,滴加到有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留试纸条样品垫上,反应5~10min,观察检测线和控制线显色情况。若检测线和控制线均显红色,则结果为阴性,表明样品中不含有有机磷类农药和氨基甲酸酯类农药;若检测线不显红色,控制线显红色,则结果为阳性,表明样品中含有有机磷类农药或氨基甲酸酯类农药;若控制线不显红色,说明试纸条失效,需使用新的试纸条进行检测。

[0066] 实施例5:灵敏度测试:

[0067] 用本发明的试纸条对40种有机磷类农药和15种氨基甲酸酯类农药进行检测,每种农药均配制成不同的浓度,结果如表1所示:

[0068] 表1试纸条灵敏度及特异性测试结果

[0069]

名称	检测限 (mg/kg)	名称	检测限 (mg/kg)
保棉磷	0.03	伏杀硫磷	0.1
倍硫磷	0.03	甲胺磷	0.02

[0070]

苯线磷	0.01	甲拌磷	0.01
丙溴磷	0.04	甲基对硫磷	0.01
敌百虫	0.07	乐果	0.05
敌敌畏	0.05	氧乐果	0.01
地虫硫磷	0.01	硫环磷	0.02
毒死蜱	0.03	氯唑磷	0.01
甲基毒死蜱	0.08	马拉硫磷	0.2
对硫磷	0.01	灭线磷	0.01
二嗪磷	0.04	内吸磷	0.01
甲基内吸磷	0.03	磷胺	0.02
噻唑磷	0.05	苯硫威	0.1
三唑磷	0.03	克百威	0.01
久效磷	0.02	丁硫克百威	0.03
杀螟硫磷	0.08	丙硫克百威	0.05
杀扑磷	0.04	甲萘威	0.8
水胺硫磷	0.02	灭多威	0.05
特丁硫磷	0.01	杀线威	0.07
辛硫磷	0.05	涕灭威	0.01
蚜灭磷	0.6	异丙威	0.1
亚胺硫磷	0.03	仲丁威	0.03
百治磷	0.02	速灭威	0.2
乙硫磷	0.2	抗蚜威	0.02
乙酰甲胺磷	0.1	猛杀威	0.09
蝇毒磷	0.03	残杀威	0.1
治螟磷	0.01	甲硫威	0.03
二溴磷	0.5		

[0071] 图表说明：本发明的试纸条对有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留的检测限在0.01~0.8mg/kg之间，说明本发明的试纸条可对大多数有机磷类农药和氨基甲酸酯类农药进行检测。

[0072] 实施例6：特异性测试：

[0073] 用本发明的试纸条对10种其他种类农药和10种非农药进行检测，结果显示，联苯菊酯、氯氰菊酯、氟氯氰菊酯、滴滴涕、六六六、硫丹、五氯硝基苯、七氯、艾氏剂、三氯杀螨醇等10种其他种类农药检测结果为阴性，叶绿素、叶黄素、玉米黄素、矢车菊素、葡萄皮色素、飞燕草素、番茄红素、辣椒红素、芹菜素、橙皮素等10种植物色素检测结果也为阴性，说明本发明的试纸条可对有机磷农药和氨基甲酸酯类农药进行特异性检测，而对其他种类农药以及多重植物色素无特异性反应。

[0074] 实施例7:稳定性测试:

[0075] 将用本发明方法制作好的试纸条装入密封袋内,内置干燥剂,于45℃烘箱内保存,分别于7天、14天、21天、28天、35天、42天取出,检测试纸条的稳定性。结果显示,45℃保存7天、14天、21天、28天,检测结果均无明显变化,45℃保存35天,金标垫上胶体金标记的抗体的复溶效果有所下降,T线和C线的颜色明显变浅,灵敏度下降。45℃保存35天,相当于常温保存12个月。

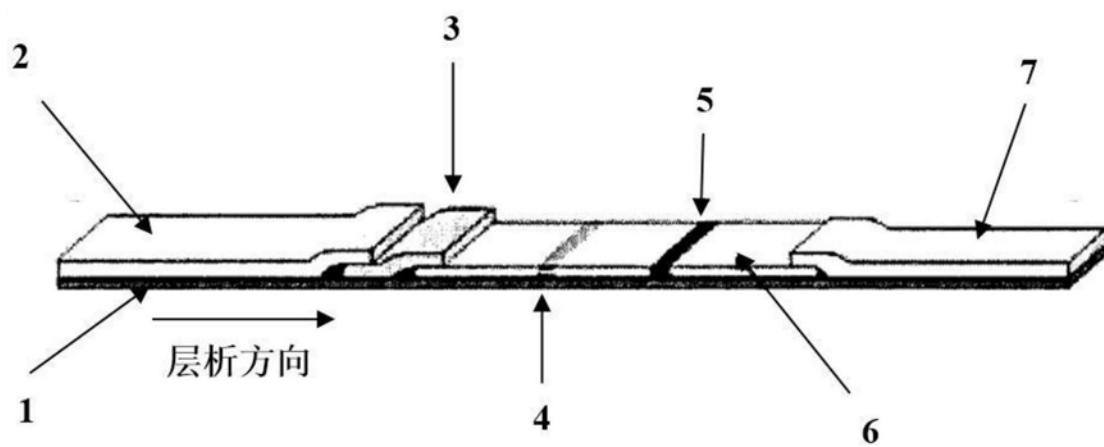


图1

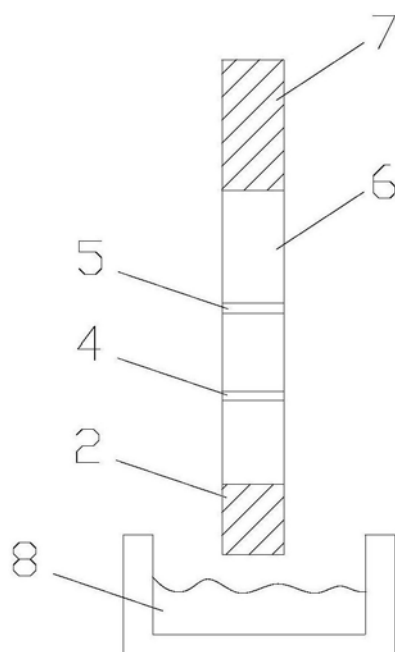


图2

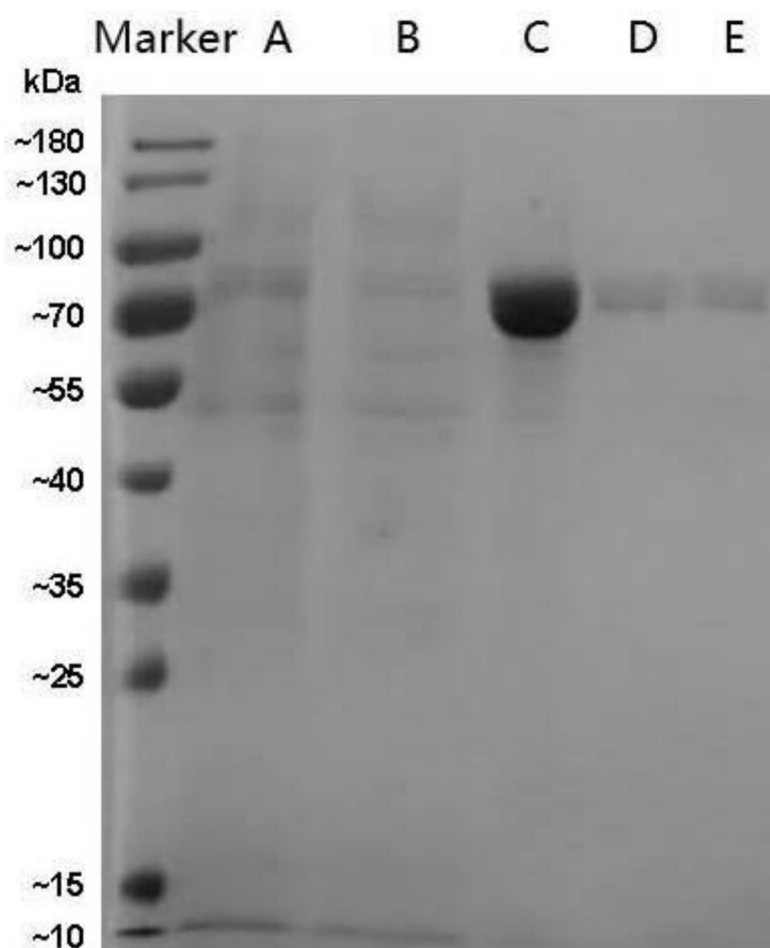


图3

专利名称(译)	有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测方法及其试纸条和制备方法		
公开(公告)号	CN110196322A	公开(公告)日	2019-09-03
申请号	CN201810160607.4	申请日	2018-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	广东志道医药科技有限公司 广州汉腾生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广东志道医药科技有限公司 广州汉腾生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广东志道医药科技有限公司 广州汉腾生物科技有限公司		
[标]发明人	冯锐 王丁力 龙飞 方铁铮 杨凯		
发明人	冯锐 王丁力 龙飞 方铁铮 杨凯		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532 G01N21/78		
CPC分类号	G01N21/78 G01N33/532 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种有机磷类和氨基甲酸酯类农药残留检测方法，包括以下步骤：通过动物细胞进行重组人乙酰胆碱酯酶的表达，重组人乙酰胆碱酯酶纯化后用胶体金进行标记，农药完全抗原与农药小分子竞争性地与重组人乙酰胆碱酯酶结合；将胶体金标记的重组人乙酰胆碱酯酶、农药完全抗原、重组人乙酰胆碱酯酶抗体等组装成试纸条；需要检测的样品经前处理后，用提取溶剂提取，得到样品溶液，将适量样品溶液滴加到样品垫上，样品溶液将会向吸水垫端移动，待3~15分钟后，根据检测线和控制线的显色情况，判断样品中是否含有有机磷类或氨基甲酸酯类农药残留。本发明可对大部分有机磷类和氨基甲酸酯类农药进行特异性识别，检测范围宽，灵敏度高。

