

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/532

G01N 33/558



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 03116692. X

[45] 授权公告日 2005 年 5 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1203317C

[22] 申请日 2003.4.29 [21] 申请号 03116692. X

[71] 专利权人 上海交通大学

地址 200030 上海市华山路 1954 号

[72] 发明人 周 培 陆贻通 李 斌 周 军

审查员 胡玉连

[74] 专利代理机构 上海交达专利事务所

代理人 王锡麟

权利要求书 2 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 克百威农药的纳米胶体金标记免疫测定方法

[57] 摘要

一种克百威农药的纳米胶体金标记免疫测定方法。属于农药残留量检测领域。以改良活性酯法将克百威免疫半抗原 BFNH 与 BSA 偶联，合成人工免疫抗原复合物，免疫动物，制备特异性高效价抗 BFNH 抗体，抗体经分离纯化后，将纳米级的胶体金标记于抗克百威的特异性抗体，然后将此标记结合物、偶联卵清蛋白的克百威以及羊抗鼠 IgG 分别固化在一载体上，根据竞争抑制免疫层析原理，进行克百威农药的半定量分析测定，所建立的检测体系对克百威农药的最小检测量为 0.25mg/kg，且在 10 分钟内完成快速检测。本发明具有实质性特点和显著进步，将纳米技术及免疫技术应用于农药残留检测领域，改变了传统的农药残留多步繁琐检测问题，实现一步法快速检测克百威农药残留的方法。

知识产权出版社出版

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种克百威农药的纳米胶体金标记免疫测定方法，其具体步骤为，①人工免疫复合物的制备：以改良活性酯法将克百威免疫半抗原 BFNH 与 BSA 偶联，合成人工免疫抗原复合物；②抗克百威特异性抗体的制备：使用上述抗原复合物免疫动物，制备特异性高效价抗 BFNH 抗体；③胶体金的制备；④胶体金标记抗克百威特异性抗体：抗体经分离纯化后，将纳米级的胶体金标记于抗克百威的特异性抗体；⑤硝酸纤维素膜和玻璃纤维素膜的处理：将胶体金标记的抗克百威抗体固定在玻璃纤维素膜上；偶联卵清蛋白的克百威以及羊抗鼠 IgG 固定在硝酸纤维素膜上；⑥免疫层析试纸条的制备；⑦样品测试和结果判断方法：根据竞争抑制免疫层析原理，进行克百威农药的半定量分析测定；所建立的检测体系对克百威农药的最小检测量为 0.25mg/kg，且在 10 分钟内完成快速检测。

2、根据权利要求 1 所述的克百威农药的纳米胶体金标记免疫测定方法，其特征是，所涉及的步骤①的具体为：采用 2、3-二氢-2、2-二甲基-7-苯并呋喃酚为原料，在通光气的条件下合成 2、3-二氢-2、2-二甲基-7-苯并呋喃基氯甲酸酯，在低温条件下与 6-氨基己酸反应合成 BFNH 免疫半抗原，然后采用改良活性酯法分别合成免疫抗原和包被抗原，分别将 0.026g 半抗原溶于 1ml 无水 DMF，再加入 0.016g DCC 和 0.009g NHs，室温下反应过夜，离心取上清液，分别逐滴加入 15mg/ml 的 BSA 和 OVA 碳酸缓冲液中，磁力搅拌 4 小时，蒸馏水透析 2 次，生理盐水透析 2 次，分装冻存于-20° C 冰箱。

3、根据权利要求 1 所述的克百威农药的纳米胶体金标记免疫测定方法，其特征是，所涉及的步骤②的具体为：用合成的 BFNH-BSA 免疫 BALB/小白鼠或实验用新西兰大白兔，初次免疫用等量的福氏完全佐剂乳化人工抗原，然后以福氏不完全佐剂乳化抗原，进行六次基础免疫，采用 ELISA 法检测血清抗体效价，待血清抗体达到一定效价后进行最后一次加强免疫，采取兔子心脏血清；或用杂交瘤技术制备单抗；分离纯化，-20℃冻存储备用。

4、根据权利要求 1 所述的克百威农药的纳米胶体金标记免疫测定方法，其特征是，所涉及的步骤③的具体为：在 100ml 超纯水中加入 1ml 1%浓度的氯金酸，加热至沸腾，再加入 1%柠檬酸三钠溶液 1ml，继续煮沸 10 分钟，冷却后，4° C 保存备用，

取样扫描测定最大吸收峰并进行透射电镜观察粒子大小。

5、根据权利要求 1 所述的克百威农药的纳米胶体金标记免疫测定方法，其特征是，所涉及的步骤④的具体为：调节如上制备的胶体金溶液 100ml 的 pH 值为 8.2，快速搅拌下加入抗克百威单抗 400 μg ，使其终浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，室温反应 15 分钟后，加入聚乙二醇 PEG 至终浓度为 1%，继续搅拌 15 分钟，用 8000r/min 离心 30 分钟，吸去上清后所得沉淀即为纯化的金标记抗体，此金标记抗体复悬于保存液中，4℃保存。

6、根据权利要求 1 所述的克百威农药的纳米胶体金标记免疫测定方法，其特征是，所涉及的步骤⑤的具体为：用微量喷头喷涂两条平行线于硝酸纤维素膜上，克百威偶联卵清蛋白结合物作为测试线，羊抗鼠 IgG 作为质控线。用定量喷头喷涂金标记抗克百威抗体于玻璃纤维素膜上，干燥硝酸纤维素膜和玻璃纤维素膜后备用。

7、根据权利要求 1 所述的克百威农药的纳米胶体金标记免疫测定方法，其特征是，所涉及的步骤⑥的具体为：在 60mm×300mm 的单面胶 PVC 板上，依次粘贴上玻璃纤维素膜、已固定有金标记抗克百威抗体的玻璃纤维素膜、已平行包被克百威一卵清蛋白和抗小鼠 IgG 抗体的硝酸纤维素膜、吸水玻璃纤维素膜，用切条机将粘贴好的 PVC 板纵向切成 5mm×60mm 的试纸条。

8、根据权利要求 1 所述的克百威农药的纳米胶体金标记免疫测定方法，其特征是，所涉及的步骤⑦的具体为：将试纸条插入待测样品中，停留 5 秒后取出平放，或用滴管在样品垫上滴加 3-4 滴液体样品，10 分钟后观察结果，羊抗鼠 IgG 和克百威卵清蛋白结合物分别喷涂在硝酸纤维素膜的质控线(C)和测试线(T)，含克百威待测样品经一端根据层析原理向另一端移动，并先后越过测试线和质控线，固化在玻璃纤维膜上的金标记抗克百威特异性抗体与样品中的克百威起特异性反应，并竞争性地抑制其与测试线上的克百威结合，因此当样品中的克百威含量不到一定量时，金标记抗克百威特异性抗体与测试线克百威结合后金颗粒凝集显色，当样品中的克百威含量超过一定量时，金标记抗体完全被抑制而不显色，质控线(C)是检验方法本身有效与否而设定，显色有效，不显色表明方法本身无效。

克百威农药的纳米胶体金标记免疫测定方法

技术领域

本发明涉及的是一种将免疫化学检测技术应用于农药残留量的检测,尤其是一种克百威农药的纳米胶体金标记免疫测定方法。属于农药残留量检测领域。

背景技术

克百威(2、3-二氢-2、2-二甲基-7-苯丙呋喃基甲基氨基甲酸酯)又名克百威,是广谱、高效、药效残留期长的内吸性杀虫、杀螨、杀线虫剂,广泛用于水稻、玉米、烟草、茶、大豆、胶白、韭菜等作物的害虫防治。70年代以来通过对克百威的毒理研究发现,克百威在机体内与胆碱酯酶形成络合物,抑制其活性,使乙酰胆碱不能分解而积蓄在体内,影响中枢神经细胞间的冲动传导,具有神经毒性。该药剂在土壤中残留有效期长、药效高,能通过根、茎、叶或种子吸收传导并输送到植物体各器官,也能通过径流渗透污染地下水,对人体健康及环境造成极大的危害,因此,加强对克百威农药残留的检测十分必要。至今为止,对其残留量的检测方法主要采用液相色谱、气相色谱及光谱等物理学办法,但需昂贵仪器且耗时,不适合一定规模化的检测分析。经文献检索,发现:Development of Monoclonal Antibody-based Immunoassays to the N-Methylcarbamate Pesticide Carbofuran(甲基氨基甲酸酯农药克百威的单抗免疫测定的建立),详见:Journal of Agricultural and Food Chemistry (农业和食物化学杂志)1999, 47, 2475-2485。所列文献合成了克百威人工免疫抗原,并将人工合成的抗原免疫小鼠,采用杂交瘤技术制备了抗克百威单克隆抗体,在此基础上建立了间接和直接的酶联免疫吸附测定检测克百威农药的技术。该技术在原农药残留常规检测(气相色谱、液相色谱仪器分析方法)方法的基础上进行了革新,采用酶联免疫吸附测定技术(ELISA)进行农药残留检测,使得检测时间缩短、成本大大降低,灵敏度提高,有利于在食品、土壤和环境中克百威农药的快速检测并便于广泛地推广使用,但是其方法尚存在操作相对繁琐、需要重复多次洗涤,需要借助于酶标仪读数进行测定,不能实现真正的一步法快速检测。

发明内容

本发明的目的在于克服现有技术中的不足,提供一种克百威农药的纳米胶体金标记免疫测定方法,使纳米技术及免疫技术应用于农药残留检测领域,改变了传统的农药残留多步繁琐检测问题,实现一步法快速检测克百威农药残留的方法。

本发明是通过以下技术方案实现的,本发明以改良活性酯法将克百威免疫半抗原(BFNH)与BSA偶联,合成人工免疫抗原复合物,免疫动物,制备特异性高效价抗BFNH抗体,抗体经分离纯化后,将纳米级的胶体金标记于抗克百威的特异性抗体,然后将此标记结合物、偶联卵清蛋白的克百威以及羊抗鼠IgG分别固化在一载体上,根据竞争抑制免疫层析原理,进行克百威农药的半定量分析测定,所建立的检测体系对克百威农药的最小检测量为0.25mg/kg,且在10分钟内完成,方法稳定、快速、准确,适合于进行一步法农药残留的快速检测。以下对本发明的技术方案作出进一步说明,其具体的步骤为:

(1) 人工免疫化合物的制备

采用2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并呋喃酚为原料,在通光气的条件下合成2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并呋喃基氯甲酸酯,在低温条件下与6-氨基己酸反应合成(BFNH)免疫半抗原,然后采用改良活性酯法分别合成免疫抗原和包被抗原,分别将0.026g半抗原溶于1ml无水DMF,再加入0.016gDCC和0.009gNH₃,室温下反应过夜,离心取上清液,分别逐滴加入15mg/ml的BSA和OVA碳酸缓冲液中,磁力搅拌4小时,蒸馏水透析2次,生理盐水透析2次。分装冻存于-20℃冰箱。

(2) 抗克百威特异性抗体的制备

用合成的BFNH-BSA免疫BALB/小白鼠或实验用新西兰大白兔,初次免疫用等量的福氏完全佐剂乳化人工抗原,然后以福氏不完全佐剂乳化抗原,进行六次基础免疫,采用ELISA法检测血清抗体效价,待血清抗体达到一定效价后进行最后一次加强免疫,采取兔子心脏血清。或用杂交瘤技术制备单抗。分离纯化,-20℃冻存储备。

(3) 胶体金的制备

在100ml超纯水中加入1ml1%浓度的氯金酸,加热至沸腾,再加入1%柠檬酸三钠溶液1ml,继续煮沸10分钟,冷却后,4℃保存备用,取样扫描测定最大吸收峰并进行透射电镜观察粒子大小。

(4) 胶体金标记抗克百威特异性抗体

调节如上制备的胶体金溶液(100ml)的pH值为8.2,快速搅拌下加入抗克百威特

异性抗体 400 μg , 使其终浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 室温反应 15 分钟后, 加入聚乙二醇 (PEG) 至终浓度为 1%, 继续搅拌 15 分钟。用 8000r/min 离心 30 分钟, 吸去上清后所得沉淀即为纯化的金标记抗体, 此金标记抗体复悬于保存液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(5) 硝酸纤维素膜和玻璃纤维素膜的处理

用微量喷头喷涂两条平行线于硝酸纤维素膜上, 克百威偶联卵清蛋白结合物作为测试线, 羊抗鼠 IgG 作为质控线。用定量喷头喷涂胶体金标记抗克百威抗体于玻璃纤维素膜上, 干燥硝酸纤维素膜和玻璃纤维素膜后备用。

(6) 免疫层析试纸条的制备

在 60mm $\times$ 300mm 的单面胶 PVC 板上, 依次粘贴上玻璃纤维素膜、已固定有金标记抗克百威抗体的玻璃纤维素膜、已平行包被克百威—卵清蛋白结合物和抗小鼠 IgG 抗体的硝酸纤维素膜、吸水玻璃纤维素膜。用切条机将粘贴好的 PVC 板纵向切成 5mm $\times$ 60mm 的试纸条

(7) 样品测试和结果判断方法

将试纸条插入待测样品中, 停留 5 秒后取出平放, 或用滴管在样品垫上滴加 3-4 滴液体样品, 10 分钟后观察结果。羊抗鼠 IgG 和克百威偶联 OVA 结合物分别喷涂在 NC 膜的质控线 (C) 和测试线 (T), 含克百威待测样品经 S 端根据层析原理向另一端移动, 并先后越过测试线和质控线, 固化在玻璃纤维膜上的金标记抗克百威特异性抗体与样品中的克百威起特异性反应, 并竞争性地抑制其与测试线上的克百威结合, 因此当样品中的克百威含量不到一定量时, 金标记抗克百威特异性抗体与测试线克百威结合后金颗粒凝集显色, 当样品中的克百威含量超过一定量时, 金标记特异性抗体完全被抑制而不显色, 质控线 (C) 是检验方法本身有效与否而设定, 显色有效, 不显色表明方法本身无效。

本发明具有实质性特点和显著进步, 主要表现为反应操作简便, 不需要酶, 不需复杂繁烦的洗涤环节; 灵敏度稳定, 能快速检测样品中的待测农药的超标与否, 且便于保存; 检测速度快, 整个反应时间在 10 分钟之内完成, 能实现快速检测的需要; 将纳米技术及免疫技术应用于农药残留检测领域, 改变了传统的农药残留多步繁琐检测问题, 实现一步法快速检测克百威农药残留的方法。

具体实施方式

实施例一：

采用热法合成免疫半抗原，取呋喃酚 100g 加入 250ml 三口烧瓶，再加入 19g 催化剂三甲基苄基氯化铵，伴有电动搅拌下加热至 95℃，以一定的流量通入光气，2 小时出现沉淀，取样、气谱、质谱分析进行结构表征。然后称取 4.6g 6-氨基己酸溶于 6.4ml 4mol/L 的 NaOH 溶液中，加入 250ml 烧瓶，冰浴冷却至 4℃，称取 7.18g 苯并呋喃基氯甲酸酯溶于 20ml 二噁烷中，在搅拌情况下分 5 次间隔 10 分钟加入三口烧瓶中反应两小时，调节 pH 值至 4.0、乙酸乙酯三次萃取，析出白色沉淀，水洗烘干。

然后以改良活性酯法分别合成免疫抗原和包被抗原，分别将 0.026g 半抗原溶于 1ml 无水 DMF，再加入 0.016g DCC 和 0.009g NH₄，室温下反应过夜，离心取上清液，分别逐滴加入 15mg/ml 的 BSA 和 OVA 碳酸缓冲液中，磁力搅拌 4 小时，蒸馏水透析 2 次，生理盐水透析 2 次；用合成的 BFNH-BSA 免疫 BALB/小白鼠动物，初次免疫用等量的福氏完全佐剂乳化人工抗原，进行腹部皮下注射，然后以福氏不完全佐剂乳化抗原，进行六次基础免疫，采用 ELISA 法检测血清抗体效价，待血清抗体达到一定效价后进行最后一次加强免疫，外科手术取免疫鼠脾细胞与骨髓瘤细胞杂交、HAT 筛选并进行克隆化，筛选出能稳定分泌抗克百威单克隆抗体的细胞株，将细胞株注入小鼠腹腔，取腹水来制备单抗；

然后将经分离纯化的 400 μg 单抗加入预先制备的 40nm 大小的 pH 为 8.2 的胶体金溶液中，室温反应 15 分钟，加入聚乙二醇（PEG）至终浓度为 1%，继续搅拌 15 分钟。用 8000r/min 离心 30 分钟，吸去上清后所得沉淀即为纯化的金标记抗体。将此金标记抗体结合物喷涂于玻璃纤维素膜上，将克百威偶联-OVA 结合物喷涂于 NC 膜，作为测试线，将羊抗鼠 IgG 喷涂于 NC 膜，作为质控线，然后将样品吸收垫、喷涂有胶体金抗体的玻璃纤维、喷有测试线和质控线的 NC 膜以及吸水玻璃纤维依次粘贴于一塑料底板（5mm×6mm）。

测试样品时，将试纸条插入待测样品中，停留 5 秒后取出平放，或用滴管在样品垫上滴加 3-4 滴液体样品，10 分钟后观察结果，若只有质控线出现紫红色条带，结果为阳性，若质控线和测试线都出现紫红色条带，结果为阴性，若质控线不出现紫红色条带，认为测试结果无效。

实施例二：

采用热法合成免疫半抗原,取呋喃酚 100g 加入 250ml 三口烧瓶,再加入 19g 催化剂三甲基苄基氯化铵,伴有电动搅拌下加热至 95℃,以一定的流量通入光气,2 小时出现沉淀,取样、气谱、质谱分析进行结构表征。然后称取 4.6g 6-氨基己酸溶于 6.4ml 4mol/L 的 NaOH 溶液中,加入 250ml 烧瓶,冰浴冷却至 4℃,称取 7.18g 苯并呋喃基氯甲酸酯溶于 20ml 二噁烷中,在搅拌情况下分 5 次间隔 10 分钟加入三口烧瓶中反应两小时,调节 pH 值至 4.0、乙酸乙酯三次萃取,析出白色沉淀,水洗烘干。

然后以改良活性酯法分别合成免疫抗原和包被抗原,分别将 0.026g 半抗原溶于 1ml 无水 DMF,再加入 0.016g DCC 和 0.009g NHs,室温下反应过夜,离心取上清液,分别逐滴加入 15mg/ml 的 BSA 和 OVA 碳酸缓冲液中,磁力搅拌 4 小时,蒸馏水透析 2 次,生理盐水透析 2 次;用合成的 BFNH-BSA 免疫体格健壮的成年新西兰大白兔,初次免疫用 2.5ml 福氏完全佐剂乳化等量的人工抗原,进行背部皮内多点和大腿部肌肉注射,然后以福氏不完全佐剂乳化抗原,进行六次基础免疫,采用 ELISA 法检测血清抗体效价,待血清抗体达到一定效价后进行最后一次加强免疫,隔 7 天进行心脏采血,25-30ml/兔,分离提纯血清,-20℃冻存备用。

然后将经分离纯化的 400 μg,单抗加入预先制备的 40nm 大小的 pH 为 8.2 的胶体金溶液中,室温反应 15 分钟,加入聚乙二醇(PEG)至终浓度为 1%,继续搅拌 15 分钟。用 8000r/min 离心 30 分钟,吸去上清后所得沉淀即为纯化的金标记抗体。将此金标记抗体结合物喷涂于玻璃纤维素膜上,将克百威偶联-OVA 结合物喷涂于 NC 膜,作为测试线,将羊抗鼠 IgG 喷涂于 NC 膜,作为质控线,然后将样品吸收垫、喷涂有胶体金抗体的玻璃纤维、喷有测试线和质控线的 NC 膜以及吸水玻璃纤维依次粘贴于一塑料底板(5mm×6mm)。

测试样品时,将试纸条插入待测样品中,停留 5 秒后取出平放,或用滴管在样品垫上滴加 3-4 滴液体样品,10 分钟后观察结果,若只有质控线出现紫红色条带,结果为阳性,若质控线和测试线都出现紫红色条带,结果为阴性,若质控线不出现紫红色条带,认为测试结果无效。

专利名称(译)	克百威农药的纳米胶体金标记免疫测定方法		
公开(公告)号	CN1203317C	公开(公告)日	2005-05-25
申请号	CN03116692.X	申请日	2003-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	周培 陆贻通 李斌 周军		
发明人	周培 陆贻通 李斌 周军		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532 G01N33/558		
代理人(译)	王锡麟		
其他公开文献	CN1445548A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种克百威农药的纳米胶体金标记免疫测定方法。属于农药残留量检测领域。以改良活性酯法将克百威免疫半抗原BFNH与BSA偶联，合成人工免疫抗原复合物，免疫动物，制备特异性高效价抗BFNH抗体，抗体经分离纯化后，将纳米级的胶体金标记于抗克百威的特异性抗体，然后将此标记结合物、偶联卵清蛋白的克百威以及羊抗鼠IgG分别固化在一载体上，根据竞争抑制免疫层析原理，进行克百威农药的半定量分析测定，所建立的检测体系对克百威农药的最小检测量为0.25mg/kg，且在10分钟内完成快速检测。本发明具有实质性特点和显著进步，将纳米技术及免疫技术应用于农药残留检测领域，改变了传统的农药残留多步繁琐检测问题，实现一步法快速检测克百威农药残留的方法。