

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/547

G01N 33/535

G01N 33/531



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410065108.5

[43] 公开日 2005 年 6 月 8 日

[11] 公开号 CN 1624481A

[22] 申请日 2004. 10. 20

[21] 申请号 200410065108.5

[71] 申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路 88 号

[72] 发明人 刘曙照 王 莲 张洪程

[74] 专利代理机构 扬州苏中专利事务所

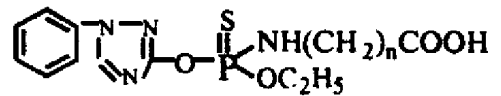
代理人 胡定华

权利要求书 2 页 说明书 5 页

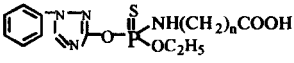
[54] 发明名称 三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒

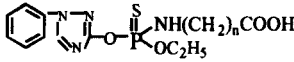
[57] 摘要

本发明涉及三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒。合成三唑磷半抗原(见化学式)并与不同蛋白质共价偶联分别合成人工抗原与包被原,以人工抗原免疫动物制备对三唑磷具特异性亲和力的抗体,以辣根过氧化物酶标记所述抗体和半抗原。用包被原或抗体包被聚苯乙烯微孔板,加入待测样品(或三唑磷标样)与酶标记物的混合液,三唑磷、酶标记物与包被在微孔表面的抗体或包被原进行竞争性结合,加入酶的底物和显色剂,酶促显色反应的强度与样品(或标样)中三唑磷的含量成反比,据此建立三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术。运用该技术,在盒内设置相应试剂与材料,制备免疫检测试剂盒,用于农产品和环境残留三唑磷的快速检测。



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

1、一种三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒，其特征是以  (n=1-5) 为半抗原，与不同蛋白质共价偶联分别合成人工抗原和包被原，以人工抗原免疫动物制备对三唑磷具特异性亲合力的抗体，以辣根过氧化物酶标记所述抗体和半抗原，用包被原或抗体包被聚苯乙烯微孔板，加入待测样品或三唑磷标样与酶标记物的混合液，三唑磷、酶标记物与包被在微孔表面的包被原或抗体发生竞争性免疫结合反应，洗涤去除游离物，加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与结合在包被原或抗体上的酶标记物的量成正比，与样品或标样中三唑磷的含量成反比，从而建立三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术并运用该技术制备三唑磷免疫检测试剂盒。

2、根据权利要求 1 所述三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒，其特征是所述半抗原是以三氯硫磷或乙氧基二氯硫磷为起始原料，合成 O-乙基-O-(1-苯基-1,2,4-三唑)-硫代磷酰氯，再与氨基酸缩合而成，其分子结构式为  (n=1-5)。

3、根据权利要求 1 所述三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒，其特征是所述人工抗原和包被原是采用活性酯法或混合酸酐法将所述半抗原与牛血清白蛋白、卵清蛋白等不同蛋白质共价偶联而成。

4、根据权利要求 1 所述三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒，其特征是所述抗体是以所述人工抗原与适量弗氏佐剂混合乳化后免疫兔、羊、鼠等动物制备的对三唑磷具有特异性亲合力的多

克隆抗体或采用杂交瘤技术制备的对氯黄隆具有特异性亲合力的单克隆抗体。

5、根据权利要求 1 所述三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒，其特征是所述酶标记物包括酶标半抗原和酶标抗体，所述酶标半抗原是采用混合酸酐法或活性酯法将所述半抗原与辣根过氧化物酶共价偶联而成，所述酶标抗体是采用改良的过碘酸盐法将辣根过氧化物酶与所述抗体共价偶联而成。

6、根据权利要求 1 所述三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒，其特征是用所述包被原或所述抗体包被微孔板，以 0.5% 明胶封闭微孔表面未吸附包被原或抗体的位点。

7、根据权利要求 1 所述三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒，其特征是所述酶的底物为过氧化脲或过氧化氢。

8、根据权利要求 1 所述三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒，其特征是所述显色剂为 3', 3', 5', 5' -四甲基联苯胺 (TMB) 或邻苯二胺 (OPD)。

9、根据权利要求 1、2、3、4、5、6、7 所述三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒，其特征是所述三唑磷免疫检测试剂盒由盒体、置于盒体内的可拆卸式微孔板、包被原或对三唑磷具特异性亲合力的抗体、碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、封闭液、三唑磷标样、酶标记物、底物液、显色剂、终止液和使用说明书组成。

## 三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒

### 技术领域

本发明涉及三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒，主要应用于粮食、果蔬、茶叶等农产品和环境残留三唑磷的快速检测。

### 背景技术

三唑磷是一种应用较为广泛的有机磷酸酯类杀虫剂，对危害水稻、棉花、粮食、果树、蔬菜等农作物的鳞翅目害虫（如螟虫、棉铃虫、红蜘蛛、蚜虫、菜青虫等）有良好的防治效果，对植物线虫和松毛虫的防治效果显著，种植前用三唑磷处理土壤，可防治地老虎等夜蛾科害虫。

三唑磷毒性分级属中毒类，对人的毒害主要有两点：一是抑制乙酰胆碱酯酶活性，二是破坏中枢神经的特殊蛋白质即神经靶细胞酶（NTE），使其活性降低而影响神经功能。三唑磷对鱼类、蜜蜂、家蚕毒性较大。

在许多国家禁止使用甲胺磷、对硫磷等高毒有机磷类杀虫剂之后，三唑磷因其杀虫谱广、药效好、且毒性中等，近年来使用量大增，对环境和食品安全的压力加大。日本农药残留检测标准规定，蔬菜中三唑磷的检出限应小于 0.02mg/kg。在欧盟指令 2000/42/EC 中，原处于开放位置的三唑磷，其最大残留限量（MRL）为 0.05mg/kg，最近被定为不得检出的农药品种，已明显影响我国农副产品的出口。

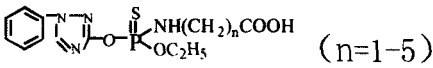
目前已报道的三唑磷残留的检测方法主要有气液色谱（GLC）法、高效液相色谱（HPLC）法和色质联用法。采用这些方法需要昂贵的仪器设备、专业化的实验室和训练有素的专门人才，对样品前处理的要求高、过程复杂、速度慢、选择性差，微量的目标分析物容易丢失，难以适应大量样本和现场快速检测的要求。酶联免疫吸附分析具有特异性强、灵敏度高、方便快捷、

廉价高效、不需要贵重仪器、可多个样品同时测定等优势。到目前为止，国内外尚未见三唑磷免疫分析技术及其试剂盒的报道。因此，建立三唑磷免疫分析技术，对于加强环境和农副产品中残留三唑磷的监测、保障食品安全和人类健康、保护环境具有重要意义。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种特异性强、灵敏度高、适合农产品和环境残留三唑磷快速检测的直接竞争酶联免疫吸附分析技术。

本发明的又一个目的是提供一种特异性强、灵敏度高、廉价高效、适合农产品和环境残留三唑磷现场快速检测的酶联免疫吸附分析试剂盒。

本发明的技术方案是：合成三唑磷半抗原  (n=1-5) 并与不同蛋白质共价偶联分别合成人工抗原和包被原，以人工抗原免疫动物制备对三唑磷具特异性亲合力的抗体，以辣根过氧化物酶标记抗体和半抗原。用包被原或抗体包被聚苯乙烯微孔板，加入待测样品（或三唑磷标样）与酶标记物的混合液，三唑磷、酶标记物与吸附在微孔表面的包被原或抗体发生竞争性免疫结合反应，洗涤去除游离物，加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与结合在包被原或抗体上的酶标记物的量成正比，与样品（或标样）中三唑磷的含量成反比，从而建立三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术。运用该技术，在盒体内设置可拆卸式微孔板、包被原或对氯黄隆具特异性亲合力的抗体、碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、封闭液、三唑磷标样、酶标记物、底物液、显色剂、终止液和使用说明书，制备三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析试剂盒。

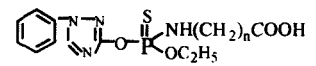
本发明的科学性强、技术先进、应用简便。本发明的基本依据是小分子化合物免疫分析化学原理和技术。分子量小于 5000 道尔顿的化合物一般不具备免疫原性，将三唑磷以半抗原的形式分别与不同蛋白质共价偶联制备人工抗原和包被原，以人工抗原免疫动物产生对三唑磷具特异性亲合力的抗

体。小分子化合物虽然不具备免疫原性但具有反应原性，能与对应抗体在离体条件下发生免疫结合反应并符合质量作用定律。以辣根过氧化物酶标记对三唑磷具特异性亲合力的抗体和三唑磷半抗原，用包被原或对三唑磷具特异性亲合力的抗体包被聚苯乙烯微孔板，在微孔板的孔中加入待测样品（或三唑磷标样）与酶标记物的混合液，三唑磷、酶标记物与包被在微孔表面的抗体或包被原发生竞争性免疫结合反应，洗涤去除游离物，加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与结合在包被原或抗体上的酶标记物的量成正比，与样品（或标样）中三唑磷的含量成反比，据此建立三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术。运用这一技术制备的三唑磷免疫检测试剂盒，适合农产品和环境残留三唑磷的现场快速检测，试剂盒对三唑磷检测的线性浓度范围是  $10^{-3} \sim 10^0 \mu\text{g/mL}$ ，最低检测限  $0.5 \text{ ng/mL}$ ，有很高的实用价值、广泛的推广应用前景和明显的社会效益。

### 具体实施方式

#### 一、三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术实施例

以三氯硫磷或乙氧基二氯硫磷为起始原料，合成 O-乙基-O-(1-苯基-1,2,4-三唑)-硫代磷酰氯，再与氨基酸缩合生成



( $n=1-5$ )，以此为半抗原，采用活性酯法或混合酸酐法与牛血清白蛋白、卵清蛋白等不同蛋白质共价偶联分别合成人工抗原和包被原。以所述人工抗原与适量弗氏佐剂混合乳化后免疫兔、羊、鼠等动物制备对三唑磷具有特异性亲合力的多克隆抗体或采用杂交瘤技术制备对三唑磷具特异性亲合力的单克隆抗体。采用混合酸酐法或活性酯法将所述半抗原与辣根过氧化物酶共价偶联制备酶标半抗原，采用改良的过碘酸盐法将辣根过氧化物酶与所述抗体共价偶联制备酶标抗体。用所述包被原或抗体包被聚苯乙烯微孔板，以 0.5%

明胶封闭微孔表面未吸附包被原或抗体的位点。在包被好抗体或包被原的微孔板的孔中加入待测样品（或三唑磷标样）与酶标记物的混合液，三唑磷、酶标记物与包被在微孔表面的包被原或抗体发生竞争性免疫结合反应，洗涤去除游离物，加入酶的底物过氧化脲和显色剂 TMB 的混合液（也可用过氧化氢作酶的底物，OPD 作显色剂），在适当条件下反应一定时间后终止，酶促显色反应的强度与结合在包被原上的酶标抗体或结合在抗体上的酶标半抗原的量成正比，与样品或标样中三唑磷的含量成反比，据此建立三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术，对待测样品中的三唑磷进行定性定量快速检测。

## 二、三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析试剂盒制备实施例

1. 微孔板的包被 将包被原用碳酸盐缓冲液稀释成适当浓度或将抗体用稀释 20 倍的磷酸盐缓冲液溶解成适当浓度，加入微孔板的孔中，100 $\mu$ L/孔，4 $^{\circ}$ C 吸附过夜。去除孔中的溶液，拍干，加入封闭液，150 $\mu$ L/孔，4 $^{\circ}$ C 封闭过夜或 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 小时，去除多余的封闭液，拍干，用稀释 20 倍的磷酸盐缓冲液洗 3 次，拍干，4 $^{\circ}$ C 条件下自然干燥，加干燥剂密封包装，4 $^{\circ}$ C 以下保存备用。也可将包被原或抗体、缓冲液、封闭液分别装入指定容器，置试剂盒内，由用户在使用前按使用说明自行包被。

2. 碳酸盐缓冲液的配制 0.1mol/L 碳酸钠溶液 150mL 与 0.1mol/L 碳酸氢钠溶液 350mL 混匀，加 2g  $\text{NaN}_3$  溶解，定容至 1000mL。

3. 三唑磷标样溶液的配制 准确称取三唑磷标样 0.0100g，溶于 100mL 乙腈，4 $^{\circ}$ C 保存。

4. 酶标半抗原的制备 采用混合酸酐法或活性酯法将所述半抗原与辣根过氧化物酶共价偶联，透析去除游离的小分子化合物后保存于 50%的甘油中，包被抗体直接结合法测定酶标半抗原效价，制备试剂盒时将酶标半抗原用 50%甘油稀释至使用浓度的 100 倍，4 $^{\circ}$ C 以下保存。

5. 酶标抗体的制备 采用改良的过碘酸盐法将辣根过氧化物酶与对三

唑磷具特异性亲合力的抗体共价偶联，Sephadex G200 柱层析纯化后保存于50%的甘油中，包被原包被直接结合法测定酶标抗体效价，制备试剂盒时将酶标抗体用50%甘油稀释至使用浓度的100倍，4℃以下保存。

6. 磷酸盐缓冲液的配制 0.2mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  510 mL 加 0.2mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  490 mL、 $\text{NaN}_3$  2g、吐温-20 2mL 溶解混匀，4℃保存。

7. 封闭液的配制 5.0g 明胶、0.5g  $\text{NaN}_3$  溶于 0.01mol/L pH6.8 的磷酸盐缓冲液并定容至 1000mL，4℃保存。

8. 底物液的配制 0.6g 过氧化脲溶于 1000mL 柠檬酸-磷酸盐缓冲液 (5.2g 柠檬酸、18.4g 磷酸氢二钠溶于蒸馏水并定容至 1000mL)，4℃保存。

9. 显色剂的配制 0.44g TMB 溶于 3.2mL 无水乙醇，用柠檬酸-磷酸盐缓冲液定容至 1000mL，充  $\text{N}_2$  或减压脱气，4℃保存。

10. 终止液的配制 100mL 浓硫酸在搅拌下慢慢加入 800mL 蒸馏水中，冷却。

11. 试剂分装 各种试剂按要求配制，测定合格后无菌分装。包被原或对三唑磷具特异性亲合力的抗体适量/瓶、三唑磷标样 0.1mL/瓶、酶标抗体 0.1mL/瓶、酶标半抗原 0.1mL/瓶、碳酸盐缓冲液 12 mL L/瓶、封闭液 16mL/瓶、磷酸盐缓冲液 10mL/瓶、底物液 6mL/瓶、显色剂 6mL/瓶、终止液 6mL/瓶。分装后贴标签，注明批号和有效期，4℃存放。

12. 试剂盒组装 分别将可拆卸式微孔板 1 块，包被原或对三唑磷具特异性亲合力的抗体、三唑磷标样溶液、酶标抗体或酶标半抗原、碳酸盐缓冲液、封闭液、磷酸盐缓冲液、底物液、显色剂、终止液各 1 瓶，使用说明书 1 份置试剂盒内指定位置(也可事先将包被原或抗体包被在微孔板上并封闭，置试剂盒内指定位置)。试剂盒检验合格后封装，4℃保存。

专利名称(译)	三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN1624481A</a>	公开(公告)日	2005-06-08
申请号	CN200410065108.5	申请日	2004-10-20
[标]申请(专利权)人(译)	扬州大学		
申请(专利权)人(译)	扬州大学		
[标]发明人	刘曙照 王莲 张洪程		
发明人	刘曙照 王莲 张洪程		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/535 G01N33/547		
代理人(译)	胡定华		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒。合成三唑磷半抗原(见化学式)并与不同蛋白质共价偶联分别合成人工抗原与包被原,以人工抗原免疫动物制备对三唑磷具特异性亲合力的抗体,以辣根过氧化物酶标记所述抗体和半抗原。用包被原或抗体包被聚苯乙烯微孔板,加入待测样品(或三唑磷标样)与酶标记物的混合液,三唑磷、酶标记物与包被在微孔表面的抗体或包被原进行竞争性结合,加入酶的底物和显色剂,酶促显色反应的强度与样品(或标样)中三唑磷的含量成反比,据此建立三唑磷直接竞争酶联免疫吸附分析技术。运用该技术,在盒内设置相应试剂与材料,制备免疫检测试剂盒,用于农产品和环境残留三唑磷的快速检测。

