



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104764880 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 08

(21) 申请号 201410007117. 2

(22) 申请日 2014. 01. 08

(71) 申请人 马晓宁

地址 116081 辽宁省大连市沙河口区兰田街  
10号5-3

申请人 纪明山 魏松红

(72) 发明人 魏松红 纪明山 马晓宁

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

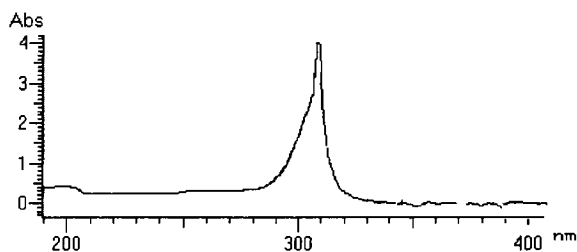
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种甲拌磷残留的酶联免疫检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种甲拌磷残留的酶联免疫检测方法,所述酶联免疫检测方法包括以下步骤:①合成甲拌磷半抗原;②合成甲拌磷完全抗原,甲拌磷完全抗原包括甲拌磷免疫抗原和甲拌磷包被抗原;③制备甲拌磷多克隆抗体;④酶标抗原的制备;⑤用甲拌磷包被抗原包被酶标板;⑥相关溶液的配制;⑦检测。该甲拌磷的酶联免疫检测方法能够现场大量快速检测土壤、水、农产品等样品中残留的甲拌磷,该方法灵敏度、准确度和精密度高,该酶联免疫检测方法用包被抗原预包被酶标板,节约了甲拌磷抗体的用量,而且克服了直接包被抗体不利于试剂盒长期保存的问题。



1. 一种甲拌磷残留的酶联免疫检测方法,其特征在于:所述酶联免疫检测方法包括以下步骤:

①合成甲拌磷半抗原,包括甲拌磷半抗原前体的合成和甲拌磷半抗原的合成;

②并用步骤①中所述的甲拌磷半抗原合成甲拌磷完全抗原,所述甲拌磷完全抗原包括甲拌磷免疫抗原和甲拌磷包被抗原;所述甲拌磷免疫抗原是用 N,N'-二环己基碳二亚胺法将所述甲拌磷半抗原与牛血清白蛋白共价偶联所得,所述甲拌磷包被抗原是用 N,N'-二环己基碳二亚胺法将所述甲拌磷半抗原与鸡卵清白蛋白共价偶联所得;

③制备甲拌磷多克隆抗体:a. 将步骤②中所述的甲拌磷免疫抗原与弗氏佐剂充分混合,形成油包水的结构为止;b. 将步骤 a 中形成油包水的结构后立即对免疫动物进行免疫注射,免疫注射的次数为 4~7 次;c. 测定血清中抗甲拌磷抗体效价;d. 用辛酸-硫酸铵法进行纯化,得到对甲拌磷具有特异性反应的所述甲拌磷多克隆抗体;

④酶标抗原的制备:采用混合酸酐法将羊抗兔或羊抗鼠与辣根过氧化物酶共价偶联制得所述酶标抗原;

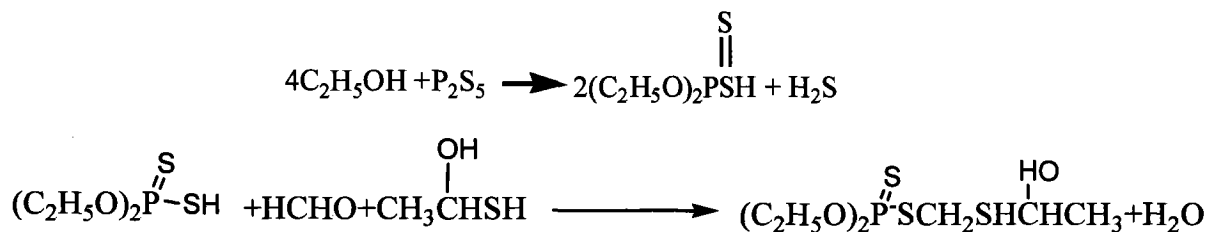
⑤用步骤②中所述的甲拌磷包被抗原包被酶标板,洗涤去除游离物并封闭,所述酶标板 96 孔或 48 孔的聚苯乙烯微孔板;所述封闭采用封闭液进行进行封闭,所述封闭液为非牛源血清白蛋白的磷酸盐缓冲液溶液;

⑥准备洗涤液、底物显色液、反应终止液、磷酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液以及封闭液;

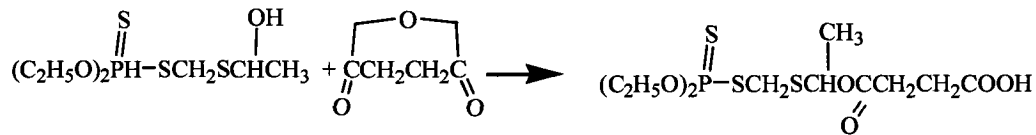
⑦在步骤⑤中所述的酶标板的微孔条中加入甲拌磷标样或待测样品和所述的甲拌磷多克隆抗体,反应 60~70 分钟后,倒出微孔条中的液体,用所述洗涤液进行洗涤;再加入步骤③所述的酶标抗原,反应 60~70 分钟后,倒出微孔条中的液体,用所述洗涤液进行洗涤;加入所述的底物显色液,反应 30min,再加入所述的反应终止液,测定 OD 值。

2. 根据权利要求 1 所述的甲拌磷残留的酶联免疫检测方法,其特征在于:所述甲拌磷免疫抗原和甲拌磷包被抗原通过紫外吸收光谱法进行鉴定。

3. 根据权利要求 1 所述的甲拌磷残留的酶联免疫检测方法,其特征在于:所述甲拌磷半抗原前体的合成方法为:①在反应瓶中加 11.1g  $P_2S_5$ ,逐滴滴入无水乙醇 9.66g,在 75~85℃下,搅拌,溶液呈淡黄色后,停止反应,得到硫化物;②反应瓶中加入步骤①中所得的硫化物,在室温条件下,滴加 10g 30% 甲醛水溶液,磁力搅拌 20min 后,加入 7.9g 2-巯基乙醇在 60℃反应 5h,柱色谱层析,得到所述甲拌磷半抗原前体,该甲拌磷半抗原前体具有特征基团羟基,其合成路线如下。



4. 根据权利要求 1 所述的甲拌磷残留的酶联免疫检测方法,其特征在于:所述甲拌磷半抗原的合成方法为:在反应瓶中加入所述甲拌磷半抗原前体与丁二酸酐,以 4-二甲氨基吡啶作为催化剂进行反应,得所述甲拌磷半抗原,该甲拌磷半抗原上的羧基能够与蛋白质共价偶联,其合成路线如下。



5. 根据权利要求1所述的甲拌磷残留的酶联免疫检测方法,其特征在于:步骤②中所述免疫动物为兔、羊、狗或鼠。

6. 根据权利要求5所述的甲拌磷残留的酶联免疫检测方法,其特征在于:所述免疫动物为雄性新西兰大白兔。

7. 根据权利要求1所述的甲拌磷残留的酶联免疫检测方法,其特征在于:所述甲拌磷多克隆抗体能够用甲拌磷单克隆抗体或甲拌磷基因工程抗体中的一种代替。

8. 根据权利要求7所述的甲拌磷残留的酶联免疫检测方法,其特征在于:所述甲拌磷单克隆抗体的制备方法:a. 用所述甲拌磷免疫抗原免疫小鼠,得血液里含有甲拌磷的鼠的细胞;b. 将鼠的细胞与骨髓瘤细胞融合,筛选阳性孔,并对所述阳性孔进行克隆化,得到单克隆抗体的杂交瘤细胞株;c. 采用体内诱生法,得到所述的甲拌磷单克隆抗体。

9. 根据权利要求7所述的甲拌磷残留的酶联免疫检测方法,其特征在于:所述甲拌磷基因工程抗体是将甲拌磷免疫抗原免疫小鼠,提取小鼠脾细胞 RNA,以逆转录得到的 cDNA 为模板,PCR 扩增抗体,将抗体中的轻链、重链连接成 ScFv 酶切经 PCR 扩增的 ScFv 片段,并与噬菌体载体连接,转化入大肠杆菌进行表达,纯化,得到所述甲拌磷基因工程抗体。

10. 根据权利要求1所述的甲拌磷残留的酶联免疫检测方法,其特征在于:步骤⑥中所述的操作过程是在 37°C 下进行反应的。

## 一种甲拌磷残留的酶联免疫检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及药物领域中一种诊断方法,具体涉及一种甲拌磷残留的酶联免疫检测方法。

### 背景技术

[0002] 甲拌磷 [phorate, O, O- 二乙基 -S-( 乙硫基甲基 ) 二硫化磷酸酯 ] 是有机磷类的高效广谱的内吸性杀虫杀螨剂,具有触杀、胃毒、熏蒸作用,高毒,主要用于防治棉花,甜菜,小麦,高粱和油菜上的害虫,只用于拌种。甲拌磷进入植物体后,受植物代谢的影响而转化为毒性更大的氧化物 ( 亚砒,砒 ), 昆虫取食后体内神经组织中的乙酰胆碱酯酶的活性受到抑制,从而破坏了正常的神经冲动传导,而导致中毒,直至死亡。并有较长的残效期 ( 约 1 ~ 2 个月,甚至更长 ), 对人类的健康存在着潜在的威胁。世界粮农组织 (FAO) 规定甲拌磷的最高残留限量 : 在粮食作物中不允许存在残留,在棉花中应小于 0.05mg/g, 蔬菜残留不得检出。但是由于其杀虫作用好,目前在蔬菜,粮食等上存在不合理使用的现象比较严重。对公众健康具有较大危害。另外甲拌磷在土壤中不易降解,极易污染土壤和水源,容易造成环境污染。因此除加强甲拌磷的使用管理,从源头控制的同时,还应加强对其在农产品,土壤,水源等方面的检测盒监管,防止其进入食物链。

[0003] 目前,有关甲拌磷残留量的分析多采用气相色谱法 (GC) 和液相色谱法 (Paul and Zavitsanos et al, 2002)。由于常规仪器分析方法前处理步骤复杂,费时费力、设备昂贵,检测费用高,需要专业人员操作,不适宜大量样品和现场快速检测。对于待检样品量、特别是现场快速检测样品量的迅速增加,开发和应用可靠、灵敏、快速、实用的残留分析新技术,成为监测和控制残留、保证食用农产品安全和避免国际间贸易争端的重要前提。而酶联免疫分析 (ELISA) 快速检测技术因其成本低,速度快,一次检测样本量大,仪器化程度低,现已成为常用的检测方法,因此开发甲拌磷特异,灵敏,且适用于现场大批量样本快速筛选的酶联免疫方法具有重大的现实意义。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种甲拌磷残留的酶联免疫检测方法,该方法能够现场大量快速检测土壤、水、农产品等样品中残留的甲拌磷,该方法灵敏度、准确度和精密度高,该酶联免疫检测方法用包被抗原预包被酶标板,节约了甲拌磷抗体的用量,而且克服了直接包被抗体不利于试剂盒长期保存的问题。

[0005] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现 :

[0006] 一种甲拌磷残留的酶联免疫检测方法,所述酶联免疫检测方法包括以下步骤 :

[0007] ①合成甲拌磷半抗原,包括甲拌磷半抗原前体的合成和甲拌磷半抗原的合成 ;

[0008] ②并用步骤①中所述的甲拌磷半抗原合成甲拌磷完全抗原,所述甲拌磷完全抗原包括甲拌磷免疫抗原和甲拌磷包被抗原 ;所述甲拌磷免疫抗原是用 N,N' - 二环己基碳二亚胺法将所述甲拌磷半抗原与牛血清白蛋白 (BSA) 共价偶联所得,所述甲拌磷包被抗原是用

N, N' - 二环己基碳二亚胺法将所述甲拌磷半抗原与鸡卵清白蛋白 (OVA) 共价偶联所得 ;

[0009] ③制备甲拌磷多克隆抗体 :a. 将步骤②中所述的甲拌磷免疫抗原与弗氏佐剂充分混合,形成油包水的结构为止 ;b. 将步骤 a 中形成油包水的结构后立即对免疫动物进行免疫注射,免疫注射的次数为 4 ~ 7 次 ;c. 测定血清中抗甲拌磷抗体效价 ;d. 用辛酸 - 硫酸铵法进行纯化,得到对甲拌磷具有特异性反应的所述甲拌磷多克隆抗体 ;

[0010] ④酶标抗原的制备 :采用混合酸酐法将羊抗兔或羊抗鼠与辣根过氧化物酶共价偶联制得所述酶标抗原 ;

[0011] ⑤用步骤②中所述的甲拌磷包被抗原包被酶标板,洗涤去除游离物并封闭,所述酶标板 96 孔或 48 孔的聚苯乙烯微孔板 ;所述封闭采用封闭液进行进行封闭,所述封闭液为非牛源血清白蛋白的磷酸盐缓冲液溶液 ;

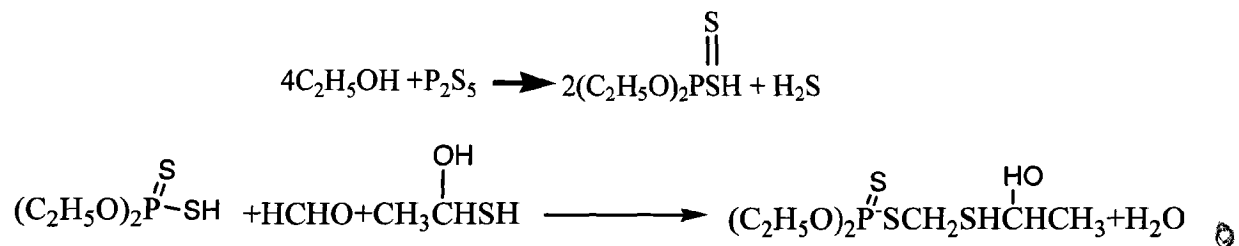
[0012] ⑥准备洗涤液、底物显色液、反应终止液、磷酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液以及封闭液 ;

[0013] ⑦在步骤⑤中所述的酶标板的微孔条中加入甲拌磷标样或待测样品和所述的甲拌磷多克隆抗体,反应 60 ~ 70 分钟后,倒出微孔条中的液体,用所述洗涤液进行洗涤 ;再加入步骤③所述的酶标抗原,反应 60 ~ 70 分钟后,倒出微孔条中的液体,用所述洗涤液进行洗涤 ;加入所述的底物显色液,反应 30min,再加入所述的反应终止液,测定 OD 值。

[0014] 进一步地,所述甲拌磷免疫抗原和甲拌磷包被抗原通过紫外吸收光谱法进行鉴定。

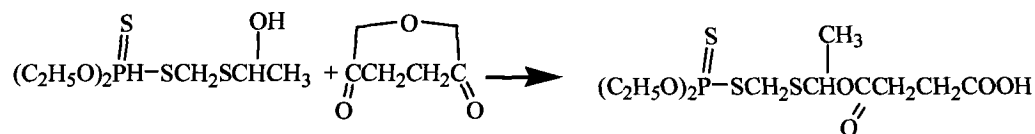
[0015] 进一步地,所述甲拌磷半抗原前体的合成方法为 :①在反应瓶中加 11.1g  $P_5S_5$ ,逐滴滴入无水乙醇 9.66g,在 75 ~ 85°C 下,搅拌,溶液呈淡黄色后,停止反应,得到硫化物 ;②反应瓶中加入步骤①中所得的硫化物,在室温条件下,滴加 10g 30% 甲醛水溶液,磁力搅拌 20min 后,加入 7.9g 2-巯基乙醇在 60°C 反应 5h,柱色谱层析,得到所述甲拌磷半抗原前体,该甲拌磷半抗原前体具有特征基团羟基,其合成路线如下。

[0016]



[0017] 进一步地,所述甲拌磷半抗原的合成方法为 :在反应瓶中加入所述甲拌磷半抗原前体与丁二酸酐,以 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 作为催化剂进行反应,得所述甲拌磷半抗原,在反应过程中将所述甲拌磷半抗原前体上的特征基团羟基衍生为羧基,该甲拌磷半抗原上的羧基能够与后续反应中的蛋白质共价偶联,其合成路线如下。

[0018]



[0019] 进一步地,所述酶标抗原是采用混合酸酐法将半抗原与辣根过氧化物酶共价偶联

而成。

[0020] 进一步地,步骤⑥中所述的操作过程是在 37℃ 下进行反应的。

[0021] 进一步地,所述免疫动物为雄性新西兰大白兔。

[0022] 进一步地,所述甲拌磷多克隆抗体能够用甲拌磷单克隆抗体或甲拌磷基因工程抗体中的一种代替。

[0023] 进一步地,所述甲拌磷单克隆抗体的制备方法:a. 用所述甲拌磷免疫抗原免疫小鼠,得血液里含有甲拌磷的鼠的细胞;b. 将鼠的细胞与骨髓瘤细胞融合,筛选阳性孔,并对所述阳性孔进行克隆化,得到单克隆抗体的杂交瘤细胞株;c. 采用体内诱生法,得到所述的甲拌磷单克隆抗体。

[0024] 进一步地,所述甲拌磷基因工程抗体是将甲拌磷免疫抗原免疫小鼠,提取小鼠脾细胞 RNA,以逆转录得到的 cDNA 为模板,PCR 扩增抗体,将抗体中的轻链、重链连接成 ScFv(single-chain variable fragment) 酶切经 PCR 扩增的 ScFv 片段,并与噬菌体载体连接,转化入大肠杆菌进行表达,纯化,得到所述甲拌磷基因工程抗体。

[0025] 本发明提供了一种甲拌磷残留的酶联免疫检测方法,该酶联免疫检测方法主要的有益效果包括以下步骤:

[0026] 1. 本发明采用包被抗原预包被酶标板,节约了甲拌磷抗体的用量,而且克服了直接包被抗体不利于试剂盒长期保存的问题。

[0027] 2. 本发明采用了高特异性,高亲和力的甲拌磷抗体,提高了检测的灵敏度,准确度和精密度。

[0028] 3. 本发明用于土壤,水,农产品等样品中甲拌磷的的残留检测,操作简单,快速,能同时检测大批量样品,成本远低于传统甲拌磷检测方法,适用于农药甲拌磷现场监控的痕量分析,具有重要的现实意义。

## 附图说明

[0029] 下面根据附图对本发明作进一步详细说明。

[0030] 图 1 是本发明实施例所述的甲拌磷半抗原的紫外吸收图谱;

[0031] 图 2 是本发明实施例所述的牛血清白蛋白 (BSA) 的紫外吸收图谱;

[0032] 图 3 是本发明实施例所述的甲拌磷免疫抗原的紫外吸收图谱;

[0033] 图 4 是本发明实施例所述的鸡卵清白蛋白 (OVA) 的紫外吸收图谱;

[0034] 图 5 是本发明实施例所述的甲拌磷包被抗原的紫外吸收图谱。

## 具体实施方式

[0035] 本发明实施例所述的一种甲拌磷残留的酶联免疫检测方法,该检测甲拌磷的酶联免疫方法是:首先将包被抗原吸附于固相载体上,然后加入待测样本(即待测农药)和人工制备的甲拌磷抗体(包括多克隆抗体、单克隆抗体或基因工程抗体),再加入酶标抗原,酶标抗原与待测农药竞争甲拌磷抗体,若待测农药含量高,则与甲拌磷抗体结合的酶标抗原就少,反之结合的酶标抗原就多,反应后加入底物显色液加以测定,当甲拌磷抗体量一定时,加入待测农药越多,与甲拌磷抗体结合的酶标抗原就越少,发色反应减弱,抑制率增高,反之,则发色反应增强,抑制率减弱,因而根据已知量的甲拌磷标准曲线和待测样本的抑制

率,再根据抑制率与甲拌磷浓度之间的半对数关系得到标准曲线,从而推算出待测物的浓度。

[0036] 下面以具体实验案例为例来说明具体实施方式,应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0037] 实施例 1

[0038] 几种溶液的配制:

[0039] (1) 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.20g;

[0040] (2) 洗涤液 (PBST): 0.05% 吐温-20 的 PBS;

[0041] (3) 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液 (CBS, pH9.6):  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59g;  $\text{NaHCO}_3$  2.93g, 用双蒸水定容至 1L;

[0042] (4) 封闭液: 取 5mL 非牛源血清蛋白加入到 100mL 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4) 中定容;

[0043] (5) 反应终止液 (2mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液): 取 50mL 浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 缓慢加入到 410mL 双蒸水中, 不断搅拌使之均匀散热, 防止爆沸。

[0044] (6) 取 96 孔酶标板, 以 0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲溶液稀释的甲拌磷包被抗原, 于 4℃ 包被 16h, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 经洗涤液 (PBST) 洗涤后, 以 2.5% 非牛源血清蛋白在 37℃ 下封闭 0.5h, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , PBST 洗涤 (3 次), 拍干, 保存备用。

[0045] 实施例 2

[0046] 1、碳二亚胺法合成甲拌磷免疫抗原

[0047] 称取 42mg 甲拌磷半抗原溶于 1mL N,N-二甲基甲酰胺中, 记为溶液 A, 另取 40mg N,N'-二环己基碳二亚胺溶于 1mL N,N-二甲基甲酰胺, 记为溶液 B, 然后将溶液 B 缓慢加入到溶液 A 中, 室温下磁力搅拌反应过夜; 然后将上述反应液加入到 0.2mol/L pH9.0 的硼酸盐缓冲溶液 8mL (溶解 80mg BSA) 中, 磁力搅拌下反应 5h。待反应完成后, 装入透析袋, 用 pH7.4 的磷酸缓冲溶液透析, 每天更换缓冲液 4 次, 透析 3 天。冷冻干燥后, 即得甲拌磷免疫抗原 (D-BSA), -20℃ 保存。

[0048] 2、碳二亚胺法合成甲拌磷包被抗原

[0049] 称取 42mg 甲拌磷半抗原溶于 1mL N,N-二甲基甲酰胺中, 记为溶液 A, 另取 40mg N,N'-二环己基碳二亚胺溶于 1mL N,N-二甲基甲酰胺, 记为溶液 B; 然后将溶液 B 缓慢加入到溶液 A 中, 室温下磁力搅拌反应过夜; 将上述反应液加入到 0.2mol/L pH9.0 的硼酸盐缓冲溶液 9mL (溶解 135mg OVA) 中, 磁力搅拌下反应 5h; 待反应完成后, 装入透析袋, 用 pH7.4 的磷酸缓冲溶液透析, 每天更换缓冲液 4 次, 透析 3 天; 冷冻干燥后, 即得免疫抗原 (D-OVA), -20℃ 保存。

[0050] 实施例 3

[0051] 本发明采用了甲拌磷半抗原与蛋白质的偶联的方法合成甲拌磷完全抗原, 紫外分光光度计扫描图象, 如图 1~5 所示。甲拌磷半抗原与载体蛋白偶联后, 偶联物的紫外吸收光谱兼具载体蛋白和甲拌磷半抗原的特征, 因此可知甲拌磷半抗原已经与载体蛋白质偶联成功。具体分析如下:

[0052] N,N'-二环己基碳二亚胺法将甲拌磷半抗原与 BSA 偶联为甲拌磷免疫抗原 同 BSA 和甲拌磷半抗原的紫外吸收光谱明显不同。甲拌磷半抗在 310.00nm 处有一个吸收峰,

如图 1 所述。BSA 在 209.00nm 处有吸收峰,如图 2 所述。而偶联后的化合物在 230.00nm, 280.00nm 处有吸收峰,如图 3 所述,230.00nm 处的吸收峰具有 BSA 的特征,并发生了红移,在 280.00nm 的吸收峰保留了甲拌磷半抗原衍生物的吸收峰的特征,而且吸收峰发生了蓝移。由此可以推断偶联后的化合物依然保留着蛋白质的性质,但是它的某些基团已经被修饰,说明甲拌磷半抗原衍生物已经偶联在 BSA 上。按公式计算偶联物的结合比,经计算,半抗原衍生物与 BSA 的结合比为 12 : 1。

[0053] 甲拌磷半抗原与 OVA 偶联为甲拌磷包被抗原的紫外吸收光谱也明显不同于甲拌磷半抗原、OVA 的吸收光谱。甲拌磷半抗原在 310.00nm 处有吸收峰,如图 1 所述;OVA 在 220.00nm 有吸收峰,如图 4 所述。而偶联后的化合物在 235.00nm、279nm 处有吸收峰,如图 5 所述,偶联后的光谱保持了 OVA 的特征吸收峰并发生了红移,而甲拌磷半抗原衍生物的吸收峰发生了蓝移,说明甲拌磷半抗原衍生物已经成功偶联在 OVA 上。按公式计算偶联物的结合比,经计算,半抗原与 OVA 的结合比为 10 : 1。

#### [0054] 实施例 4

[0055] ①甲拌磷多克隆抗体的制备:a. 将所述的甲拌磷免疫抗原与弗氏佐剂充分混合,形成油包水的结构为止,形成油包水的状态才能顺利将甲拌磷免疫抗原在弗氏佐剂的辅助下刺激免疫动物的免疫系统,快速的产生效价较高的抗甲拌磷抗体;b. 将步骤 a 中形成油包水的结构后立即对免疫动物,即 4 只雄性新西兰大白兔进行免疫注射,如间隔时间太长,在佐剂的作用下,稠度增强,造成免疫失败;免疫注射的次数为 4 ~ 7 次;c. 注射后,测定血清中抗甲拌磷抗体效价,有 2 只雄性新西兰大白兔的抗血清的效价较高,另 2 只抗血清的效价较低,这说明动物间个体差异可以影响甲拌磷多克隆抗体效价;经过 6 次免疫后效价达到了 32 000 倍;d. 甲拌磷多克隆抗体的纯度对检测有很大影响,必须对抗体进行纯化,用辛酸-硫酸铵法对其进行纯化,得到对甲拌磷具有特异性反应的所述甲拌磷多克隆抗体,该甲拌磷多克隆抗体的效价提高到 50 000 倍。

[0056] ②甲拌磷单克隆抗体的制备:a. 用所述甲拌磷免疫抗原免疫小鼠,可得血液里含有甲拌磷的脾细胞;b. 将鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合,用间接酶联免疫方法测定细胞上清液,筛选阳性孔,并对所述阳性孔进行克隆化,得到单克隆抗体的杂交瘤细胞株;c. 取处于对数生长期的杂交瘤细胞,并将其制成细胞悬浮液,再在液氮中进行长期保存;d. 使用时,将冷冻保存的杂交瘤细胞取出,放置在 30 ~ 40℃ 下片刻,然后离心去除冷冻液后,培养;e 采用体内诱生法,得到所述的甲拌磷单克隆抗体。

[0057] ③甲拌磷基因工程抗体的制备:将甲拌磷免疫抗原免疫小鼠,提取小鼠脾细胞 RNA,以逆转录得到的 cDNA 为模板,PCR 扩增抗体,将抗体中的轻链、重链连接成 ScFv(single-chain variable fragment)酶切经 PCR 扩增的 ScFv 片段,并与噬菌体载体连接,转化入大肠杆菌进行表达,纯化,得到所述甲拌磷基因工程抗体。

#### [0058] 实施例 5

[0059] 甲拌磷试剂盒的操作方法:取出一块包被有甲拌磷包被抗原且封闭好的酶标板,恢复到室温后备用;加入 50  $\mu$  L 标样或处理好的样品到各自孔中,标样和样品各做 3 个重复;加入甲拌磷多克隆抗体,每孔 50  $\mu$  L,37℃ 孵育 1h;倒出孔中的液体,将酶标板倒置在吸水纸上拍打,以保证完全除去孔中的液体,用 100  $\mu$  L 稀释好的 PBST 洗 3 次,拍干;然后加入 50  $\mu$  L 稀释的酶标二抗,37℃ 孵育 1h;倒出孔中的液体,将酶标板倒置在吸水纸上拍打,

以保证完全除去孔中的液体,用 100  $\mu$  L 稀释好的 PBST 洗 3 次,拍干;加入 100  $\mu$  L 显色液在 37 $^{\circ}$ C 下避光显色 30min;加入 50  $\mu$  L 反应终止液,混合好后测定  $OD_{490nm}$ 。

[0060] 标准曲线的的建立:配制 1、10、50、100、200、500、1000、2000、5000  $\mu$  g/L 的甲拌磷溶液,在加入一抗前分别添加到酶标板中,每个浓度重复 3 次,分别以空白和不加甲拌磷溶液为对照,采用间接竞争 ELISA 法进行检测。以甲拌磷溶液浓度的对数为横坐标,抑制率为纵坐标,即得其标准曲线,由图即可得其灵敏度。

[0061] 抑制率计算公式为:

[0062]

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\min})}{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min})} \times 100$$

[0063] 式中: $OD_{\max}$  为不加农药时的吸光值; $OD_x$  为加农药时的吸光值; $OD_{\min}$  为空白对照孔的吸光值。

[0064] 本发明不局限于上述最佳实施方式,任何人在本发明的启示下所作的有关本发明的任何修饰或变更,凡是具有与本申请相同或相近似的技术方案,均落在本发明的保护范围之内。

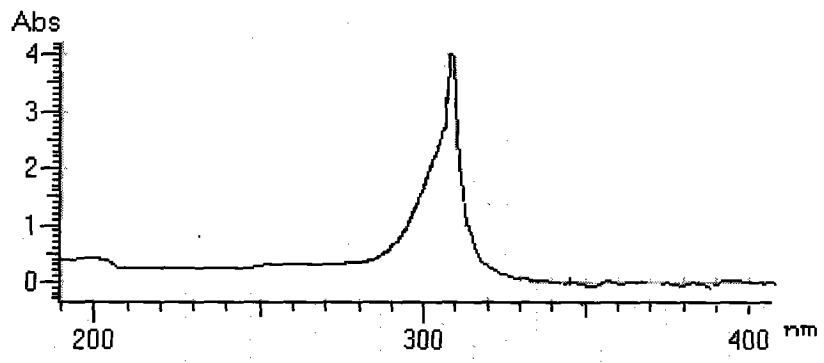


图 1

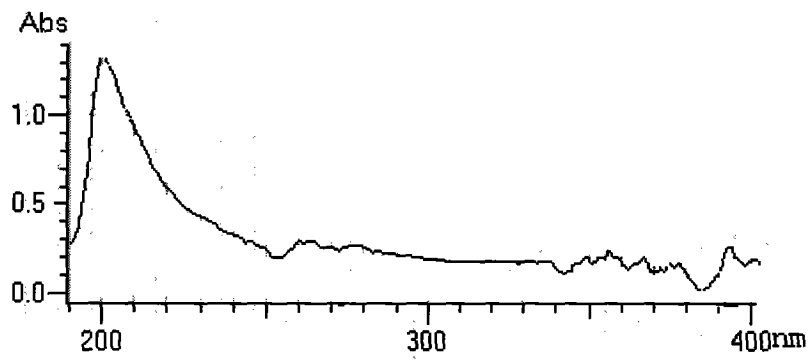


图 2

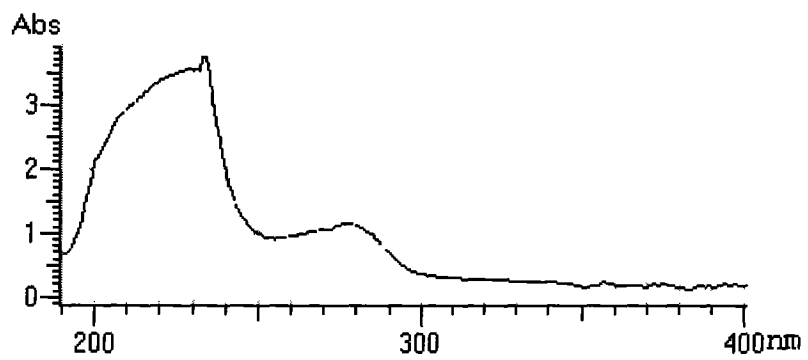


图 3

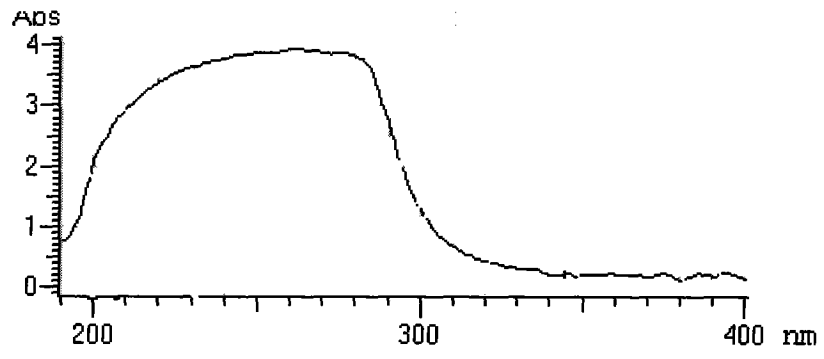


图 4

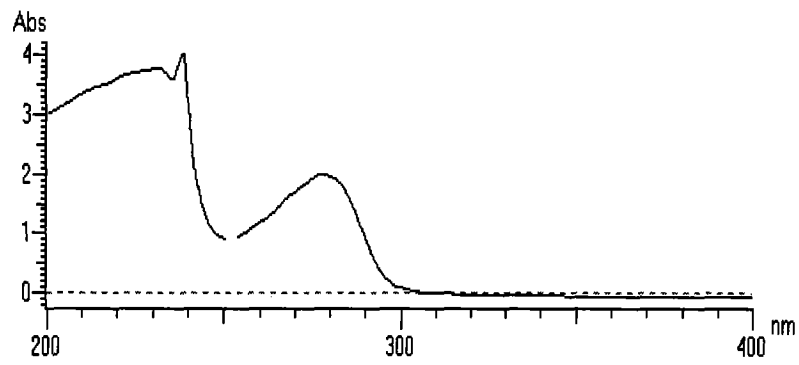


图 5

专利名称(译)	一种甲拌磷残留的酶联免疫检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104764880A</a>	公开(公告)日	2015-07-08
申请号	CN201410007117.2	申请日	2014-01-08
[标]申请(专利权)人(译)	马晓宁 纪明山 魏松红		
申请(专利权)人(译)	马晓宁 纪明山 魏松红		
当前申请(专利权)人(译)	马晓宁 纪明山 魏松红		
[标]发明人	魏松红 纪明山 马晓宁		
发明人	魏松红 纪明山 马晓宁		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种甲拌磷残留的酶联免疫检测方法，所述酶联免疫检测方法包括以下步骤：①合成甲拌磷半抗原；②合成甲拌磷完全抗原，甲拌磷完全抗原包括甲拌磷免疫抗原和甲拌磷包被抗原；③制备甲拌磷多克隆抗体；④酶标抗原的制备；⑤用甲拌磷包被抗原包被酶标板；⑥相关溶液的配制；⑦检测。该甲拌磷的酶联免疫检测方法能够现场大量快速检测土壤、水、农产品等样品中残留的甲拌磷，该方法灵敏度、准确度和精密度高，该酶联免疫检测方法用包被抗原预包被酶标板，节约了甲拌磷抗体的用量，而且克服了直接包被抗体不利于试剂盒长期保存的问题。

