

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/577

G01N 33/531 G01N 33/532



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410041895. X

[43] 公开日 2005 年 3 月 23 日

[11] 公开号 CN 1598586A

[22] 申请日 2004.9.7

[21] 申请号 200410041895. X

[71] 申请人 江苏省农业科学院

地址 210014 江苏省南京市玄武区孝陵卫钟
灵街 50 号

[72] 发明人 刘贤金 颜春荣 余向阳 张存政
王冬兰

[74] 专利代理机构 南京众联专利代理有限公司
代理人 孙忠浩

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 2 页

[54] 发明名称 用于检测有机磷农药残留的免疫抗体及其应用

[57] 摘要

本发明涉及一种用于检测有机磷农药残留免疫的抗体及其应用，其特征在于，以二乙基膦酸乙酸为半抗原，通过与牛血清蛋白(BSA)偶联制备成人工免疫原，并通过免疫新西兰大白兔制备成多克隆抗体或通过小鼠免疫、细胞融合、筛选及克隆化培养等过程制成单克隆抗体，所述的多克隆抗体或单克隆抗体可用于间接竞争性 ELISA、直接 ELISA 或免疫试纸对有机磷类农药的残留进行检测。本发明的优点在于：所选择的半抗原具有多种有机磷类农药的通用结构，不需要进行结构改造，即可与蛋白质进行藕连后免疫动物，可用于食品，水源中多种有机磷类农药的筛选检测，充分显示了免疫检测技术的快速、简便的特点。

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

1、一种用于检测有机磷农药残留的免疫抗体，其特征在于，以二乙基磷酸乙酸为半抗原；通过与牛血清蛋白（BSA）偶联制备免疫原，并通过免疫新西兰大白兔制备成多克隆抗体或通过小鼠免疫、细胞融合、筛选及克隆化培养等过程制备单克隆抗体。

2、根据权利要求1所述的用于检测有机磷农药残留的免疫抗体，其特征在于：所述的人工免疫原采用活化酯法或水溶性碳二亚胺法制备。

3、根据权利要求2所述的用于检测有机磷农药残留的免疫抗体，其特征在于：所述的采用活化酯法制备人工免疫原是这样实现的：取等摩尔量的二乙基磷酸乙酸和 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS），环二己基碳酰亚胺（DCC），用二氧六环将混合物溶解，室温下避光反应过夜，去除沉淀后取上清液干燥，将残留物悬浮在 3 毫升溶有 20mg 牛血清蛋白（BSA）的硼酸盐缓冲液中，混合物在室温下磁力搅拌 1 小时，4℃对 1 升 pH7.4 的磷酸盐缓冲液（PBS）透析，制备成免疫原。

4、根据权利要求2所述的用于检测有机磷农药残留的免疫抗体，其特征在于：所述的采用水溶性碳二亚胺法制备人工免疫原是这样实现的：先称取二乙基磷酸乙酸溶于二甲基甲酰胺（DMF）中，低温搅拌，取水溶性碳二亚胺（EDC）溶于 1mlDMF 中，缓慢加入到上述溶液中。另取牛血清蛋白（BSA）20mg 溶于 2mlDMF 中，4℃搅拌，缓慢加入到上述混合液中。4℃搅拌反应 8h，再于 14℃反应过夜，次日 2000g 离心 10min，取沉淀，透析，制备成免疫原。

5、根据权利要求1所述免疫抗体在检测中的应用，其特征在于，免疫抗体可用于对有机磷类农药的残留进行检测。

6、根据权利要求5所述免疫抗体在检测中的应用，其特征在于，所述的有机磷类农药包括毒死蜱、氧乐果、二嗪农、乙基对硫磷、丙溴磷、辛硫磷、二乙基磷酸乙酸。

7、根据权利要求5或6所述免疫抗体在检测中的应用，其特征在于：获得的单克隆抗体或多克隆抗体可用于常规的间接竞争性 ELISA 检测。

8、根据权利要求5或6所述免疫抗体在检测中的应用，其特征在于：获得的单克隆抗体或多克隆抗体通过金、酶、荧光标记抗体后用于直接 ELISA 检测。

9、根据权利要求5或6所述免疫抗体在检测中的应用，其特征在于：获得的单克隆抗体或多克隆抗体制成免疫检测试纸后，对果蔬中有机磷农药残留的检测。

用于检测有机磷农药残留的免疫抗体及其应用

技术领域：

本发明涉及一种农药残留免疫检测的免疫抗体及其应用，尤其是一种用于检测有机磷农药残留的免疫抗体及其应用。

背景技术：

农药是当前农业生产用于防治病、虫、杂草对农作物危害不可缺少的物质，对促进农业增产有极重要的作用，但同时带来严重的环境问题：生态失衡，农产品品质下降，人类身体健康受威胁。目前，有机磷、拟除虫菊酯农药具有高效的杀虫效果，是植物化学保护的主力军。随着近年来环境保护的呼声越来越高，有机磷类农药使用带来的环境问题日益引起人们的重视。

但就目前的形势而言，人类仍面临饥饿，贫穷的困扰，全面禁止农药的使用是不现实的，为了达到高产、高效的目标，农药的地位在短期内是无法取代的。鉴于此，为保障人民的身体健康，有效控制生产中农药的合理使用和对其残留量进行监控，开发一种快速、可靠、灵敏，适于农药残留现场监控的痕量分析方法具有重要的现实意义。目前有机磷类农药的残留分析方法主要是通过提取、净化后，再配以高效 HPLC 或 GC，这种检测方法费用相对昂贵、样品前处理过程复杂、对仪器设备要求较高、而且需要消耗大量的有机溶剂，从而造成对环境的二次污染。

免疫分析是一种快速、灵敏、操作简单、费用低的一种检测方法。农药多为小分子化合物，需要通过与大分子蛋白类物质藕连后才可用于免疫动物，刺激动物免疫系统来产生针对小分子农药的抗体。由于大多数农药本身不具备直接同蛋白类大分子物质藕连的位点，因此，通常需要对农药进行改造，前期研发费用较高。而且，由于抗体通常对特定物质的特异性较强，建立的免疫分析方法多只适用于单一农药残留量的检测分析，限制了免疫分析方法的应用，不能充分发挥免疫测定法的快速、操作简单、检测费用低的优点。

发明内容：

本发明的目的在于：针对目前农药残留免疫检测中存在的抗体通常对

特定物质的特异性较强，建立的免疫分析方法多只适用于单一农药残留量的检测分析，限制了免疫分析方法应用的实际问题，提供一种用于检测有机磷农药残留的免疫抗体及其应用。

本发明的目的是这样实现的：一种用于检测有机磷农药残留的免疫抗体，其特征在于，以二乙基磷酸乙酸为半抗原，通过与牛血清蛋白（BSA）偶联制备成人工免疫原，并通过免疫新西兰大白兔制备成多克隆抗体或通过小鼠免疫、细胞融合、筛选及克隆化培养等过程制成单克隆抗体，所述的人工免疫原可采用活化酯法或水溶性碳二亚胺法制备。

活化酯法制备免疫原是这样实现的：取等摩尔量的二乙基磷酸乙酸和N-羟基琥珀酰亚胺（NHS），环二己基碳酰亚胺（DCC），用二氧六环将混合物溶解，室温下避光反应过夜，离心去除沉淀后，取上清液干燥，残留物悬浮在3毫升溶有20mg牛血清蛋白（BSA）的硼酸盐缓冲液中，混合物在室温下磁力搅拌1小时，4℃对1升pH7.4的磷酸盐缓冲液（PBS）透析，制备成人工免疫原；水溶性碳二亚胺法制备人工免疫原是这样实现的：先称取二乙基磷酸乙酸溶于二甲基甲酰胺（DMF）中，低温搅拌，取水溶性碳二亚胺（EDC）溶于1mlDMF中，缓慢加入到上述溶液中。另取牛血清蛋白（BSA）20mg溶于2mlDMF中，4℃搅拌，缓慢加入到上述混合液中。继续搅拌反应8h，再于14℃反应过夜，次日2000g离心10min，取沉淀，透析，制备成免疫原。

多克隆抗体的制备方法为：以人工合成的免疫原，免疫新西兰大白兔，用加倍量抗原的生理盐水稀释液耳缘静脉注射，当效价达最佳时，心脏采血，先用硫酸铵分步沉淀法初步纯化后，再经Sephadex G-200进一步纯化得高质量广谱性抗体。

单克隆抗体的制备方法为：以人工合成的免疫原，免疫BALB/C小鼠，每只小鼠取100μg免疫原，与等体积氟氏完全佐剂混合乳化均匀，沿腹股沟注入腹腔膜内。4个周后，加强免疫，剂量不变，佐剂改为氟氏不完全佐剂。加强免疫三次后，采血测效价，待血清效价不再上升时，用两倍剂量的抗原不加佐剂免疫小鼠，三天后取脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞按5-10:1的比例混合于50ml离心管进行融合，融合后的细胞经培养后待孔内的杂交细胞数量达到300个以上时，取细胞培养上清液用于酶联免疫检

测，每次检测均为复孔检测，在每次检测后的第二天重复检测，以确证结果。将强阳性孔内的细胞用有限稀释法进行克隆培养，并跟踪记录，经过3次以上的克隆培养和检测，均为阳性的孔内的细胞即为分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。杂交瘤细胞株经过扩大培养后用来制备腹水。提前一周用0.5ml石蜡油注射小鼠腹腔，将10⁶个杂交瘤细胞悬浮在1ml无血清培养基中，注入小鼠腹腔内。10天后，小鼠腹部明显膨大，收集腹水。用正辛酸-硫酸铵沉淀法来纯化单克隆抗体。

上述抗体在检测中的应用，其特征在于，所述的多克隆抗体或单克隆抗体可用于间接竞争性ELISA、直接ELISA或免疫试纸对有机磷类农药的残留进行检测。

本发明的优点在于：在比较分析多种有机磷类农药结构的基础上，根据其共同结构特点而设计的以二乙基磷酸乙酸作为半抗原，所选择的半抗原具有多种有机磷类农药的通用结构，而且不需要进行结构改造，直接可与蛋白质进行偶联后免疫动物，所制备的抗体对毒死蜱、氧乐果、二嗪农、乙基对硫磷、丙溴磷、辛硫磷等多种有机磷类农药均有特异性，可用于食品、水源中多种有机磷类农药的筛选检测，充分显示了免疫检测技术的快速、简便的特点。

附图说明

图1是采用活化酯法制备的免疫原和包被原；

图2是采用水溶性碳二亚胺法制备的免疫原和包被原。

具体实施方式

下面结合附图对本发明作进一步的描述。

实施例一、活化酯法制备免疫原和包被抗原

取等摩尔量(0.1mmol)的二乙基磷酸乙酸(0.0196g)和NHS(0.0109g)，0.11mmol DCC(0.0226g)，加到玻璃管中，用二氧六环将混合物溶解，室温下避光反应过夜，次日15000g离心10min，去除沉淀，取上清液在35℃真空抽干，把残留物悬浮在3ml溶有20mg牛血清蛋白(BSA)(用于合成人工免疫原)或卵清蛋白(OVA)(用于合成包被抗原)的硼酸钠缓冲液中。混合物在室温下磁力搅拌1小时，4℃对1LPBS透析过夜(换液4次)。包被抗原为半抗原与卵清蛋白的偶联物，制备方法与免疫原相同。透析后的

样品用 BACKMAN DU640 紫外扫描仪进行全波长扫描鉴定偶联结果。

图 1a 是利用活化酯法制备的 BSA-半抗原的偶联物（免疫原），图 1b 是利用活化酯法制备的 OVA-半抗原的偶联物（包被原）。图 1a 中三种物质由上到下分别是载体蛋白 BSA、载体蛋白 BSA 与半抗原偶联物、半抗原的紫外吸收图谱。可以看出在 254nm 处半抗原有一波谷，载体-抗原偶联物也有波谷出现，二者在此处发生吸收峰的叠加。另外在 210nm、238nm 处也有明显的吸收叠加现象。说明二者之间发生了反应，可以推断半抗原和载体蛋白 BSA 成功偶联。图 1b 中三种物质由上到下分别是载体蛋白 OVA、载体蛋白 OVA 与半抗原偶联物、半抗原的紫外吸收图谱。可以看出在 254nm 处半抗原有一波谷，载体-抗原偶联物也有波谷出现，二者在此处发生吸收峰的叠加。另外在 210nm、238nm 处也有明显的吸收叠加现象。说明二者之间也发生了反应，可以推断半抗原和载体蛋白 OVA 成功偶联。

实施例二、水溶性碳二亚胺法制备免疫原和包被抗原

称取二乙基磷酸乙酸 0.0392 溶于 2ml 二甲基甲酰胺（DMF）中，低温搅拌。再称取水溶性碳化二亚胺（EDC）8.0 mg 溶于 1 ml DMF 中，缓慢加入到上述二乙基磷酸乙酸的 DMF 溶液中。另取 BSA（用于合成人工免疫原）或 OVA（用于合成人工包被抗原）20 mg 溶于 2 ml DMF 中，4℃搅拌，缓慢加入到上述混合液中。4℃继续搅拌反应 8h，再于 14℃反应过夜，次日 2000g 离心 10min，取沉淀，对 PH7.4 的 PBS 溶液透析 3 天后的样品用 BACKMAN DU640 紫外扫描仪进行全波长扫描鉴定偶联结果。

图 2a 是利用水溶性碳二亚胺法制备的 OVA-半抗原的偶联物（包被原），图 2b 是利用水溶性碳二亚胺法制备的 BSA-半抗原的偶联物（免疫原）。图 2a 中三种物质由上到下分别是载体蛋白 OVA、载体蛋白 OVA 与半抗原偶联物、半抗原的紫外吸收图谱。可以看出在 254nm 处半抗原有一波谷，载体-抗原偶联物也有波谷出现，二者在此处发生吸收峰的叠加。另外在 210nm、238nm 处也有明显的吸收叠加现象。说明二者之间发生了反应，可以推断半抗原和载体蛋白 OVA 成功偶联。图 2b 中三种物质由上到下分别是载体蛋白 BSA、载体蛋白 BSA 与半抗原偶联物、半抗原的紫外吸收图谱。可以看出在 254nm 处半抗原有一波谷，载体-抗原偶联物也有波谷出现，二者在此处发生吸收峰的叠加。另外在 210nm、238nm 处也有明显的吸收叠加

现象。说明二者之间也发生了反应，可以推断半抗原和载体蛋白 BSA 成功偶联。

实施例三、多克隆抗体制备。

根据实施例 1 或实施例 2 方法制备的两种免疫原各免疫 3 只新西兰大白兔，具体免疫方案如表 1。

表 1 制备有机磷多克隆抗抗体动物免疫方案

免疫次数	时间间隔	免疫部位	免疫剂量	血清采集
1	1 周（距采集阴性血清）	背部皮下	0.1mg/只免疫原加等体积福氏完全佐剂	——
2	4 周	背部皮下、足底	0.1mg/只免疫原加等体积福氏不完全佐剂	——
3	3 周	背部皮下、足底	同上	耳静脉采血测效价
4	3 周	背部皮下、足底、耳静脉	同上	耳静脉采血测效价
5	1 周	耳静脉	0.2mg/只免疫原加等量生理盐水	耳静脉采血测效价
——	10 天	——	——	心脏采血制备抗血清

完成表 1 中免疫程序后，利用方阵滴定法将两种抗血清分别用两种包被抗原进行检测，确定最佳的抗原-抗体组合及其最佳工作浓度，结果见表 2。并利用建立的抗原抗体最佳工作条件来分析不同种类的有机磷农药对该抗原-抗体结合反应的抑制作用。以二乙基磷酸乙酸为对象，建立回归方程，计算其 I_{10} 和 I_{50} 。选取 13 农药包括乙基对硫磷、甲基对硫磷、乐果、氧乐果、甲胺磷、辛硫磷、毒死蜱、二嗪农、丙溴磷、三唑磷、马拉硫磷、稻丰散、水胺硫磷，将药剂抑制率对药剂浓度进行回归分析，得出回归方程，并计算各药剂对抗体反应的 I_{50} 值，结果见表 3。

由表 2 可以看出, 用 EDC 法合成的免疫原免疫动物的效果与活性酯法相比较差。活性酯型抗原产生的抗体对 EDC 法制备的抗原有很弱的识别能力; EDC 型抗原产生的抗体对活性酯法制备的包被原没有任何作用。由活性酯法抗原得到的抗体中, 以 4310 号兔子分泌抗体效价最高, 为 1:25600, 在本文后面的研究中以该抗体为研究对象。利用 4310 号兔子产生的抗体进行方阵滴定, 所得结果为抗原、抗体最佳工作浓度均为 1:2000。

表 2 抗体效价测定结果

包被原	活性酯法 OP-BSA 抗体效价			EDC 法 OP-BSA 抗体效价		
	4324	4310	4316	4320	4343	4358
活性酯法制 OP-OVA	12800	25600	6400	-	-	-
EDC 法制备 OP-OVA	200	400	200	6400	3200	3200

以二乙基磷酸乙酸为研究对象, 建立的回归方程为 $I=0.6614+0.2291\lg C$, $r=0.9699$, $I_{50}=0.1820 \mu\text{g/ml}$, $I_{10}=0.003536 \mu\text{g/ml}$ 。多种有机磷药剂对抗体的 I_{50} 经计算示于表 3。

表 3 不同农药对抗体的抑制能力

农药种类	I_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
二乙基磷酸乙酸	0.18
毒死蜱	0.12
二嗪农	0.15
氧乐果	0.21
乙基对硫磷	0.88
丙溴磷	0.97
辛硫磷	2.5
敌敌畏	32
甲胺磷	89
马拉硫磷	200
甲基对硫磷	215
水胺硫磷	—
稻丰散	—

从表 3 可以看出, 所得抗体对多种农药产生了识别反应。抗体对抗原先导物二乙基磷酸乙酸有较强的亲和力, I_{50} 为 $0.18 \mu\text{g/ml}$ 。本方法在乐果和氧乐果之间的选择性差异较大, 二者结构上的差别在于 P-O 和 P-S 键不同, 其余基团都相同。抗体对氧乐果有较强的亲和性, 但对乐果的亲和力很弱, 由此可以看出在抗原激活免疫系统产生抗体的过程中, P=O 键起了决定性的作用。但是抗体对毒死蜱、二嗪农、乙基对硫磷的 I_{50} 均小于 $1 \mu\text{g/ml}$, 这 3 种农药都含有一个公共的结构 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-$), 说明 $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-$ 也是作为一个抗原决定簇而存在的, 起着非常重要的作用。丙溴磷因为含有一个 $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-$ 和一个 P=O, 而使抗体对其有较强的识别作用, I_{50} 为 $0.97 \mu\text{g/ml}$ 。水胺硫磷、马拉硫磷、甲基对硫磷等对抗原-抗体反应抑制能力较差, 说明抗体对这些药剂没有或只有微弱的识别能力。从以上的结果可以看出, 在二乙基磷酸乙酸羧基端偶联载体蛋白, 可以使磷酸基团上的 $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-$ 和一个 P=O 充分暴露作为抗原决定簇, 刺激动物产生抗体。

实施例四、单克隆抗体制备

取 Balb/C 小鼠 4 只, 每只小鼠 $100\mu\text{g}$ 免疫原, 与等体积氟氏完全佐剂混合乳化均匀, 沿腹股沟注入腹腔膜内。4 个周后, 加强免疫, 剂量不变, 佐剂改为氟氏不完全佐剂。加强免疫 5 次后, 断尾采血, 4 只小鼠中有 3 只血清中抗体滴度达到 1: 25600, 有 1 只达到 1: 51200 并不再上升, 此时选取效价最高的 3 号小鼠取脾细胞做融合。

在无菌操作条件下, 将脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞按 5-10: 1 的比例混合于 50ml 离心管, 加入 30ml 无血清 IPMI1640 培养基, 1200r/min 离心 10min 弃上清, 将细胞团轻轻振松, 置于 37°C 水浴中。把 1ml 50%PEG 4000 缓缓加入细胞中, 在 1min 内滴完, 同时轻轻搅动底部沉淀, 静置 1min。沿管壁缓慢加入无血清培养液终止融合过程。前 30 秒缓慢匀速加入 1ml, 后 30 秒加入 2ml, 然后快速加入 27ml 无血清培养液, 1200r/min 离心 10min, 弃上清。用 30ml HAT 培养基悬浮细胞, 将悬浮液移入预先培养有饲养细胞的 96 孔细胞培养板内, 放置在 $5\%\text{CO}_2$ 、 37.3°C 细胞培养箱内培养。并同时把未加融合剂的骨髓瘤细胞和脾细胞混合培养以作为阴性对照。融合 3 天后, 背景开始变得清晰, 非融合细胞破碎死亡, 融合的细胞形成小的细胞群落。融合 7 天后, 细胞克隆高度纯化。用 ELISA 方法初步检测结果显示

阳性反应的孔占 87%，吸光值大于 1 的强阳性孔占 6.7%。将强阳性孔内的细胞经过 4 次克隆，得到 1 株稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞为 3C3。将该株细胞扩大培养，植入已注射石蜡油的小鼠体内，7 天后，有 4 只小鼠腹部膨大，行动困难，1 只死亡，1 只腹部未产生膨大。

融合后的细胞先在 HAT 选择性培养基中筛选，5 天后换成 HT 培养液，待孔内的杂交细胞数量达到 300 个以上时，用间接 ELISA 对细胞培养上清液进行复孔检测，次日重复检测以确证结果。将强阳性孔内的细胞用有限稀释法进行克隆培养，并跟踪记录，经过 3 次以上的克隆培养和检测，均呈阳性的孔内细胞即为分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞。将杂交瘤细胞经过扩大培养，一部分细胞冻存于液氮罐中，一部分细胞用来制备腹水。

选取 6 只经产 Balb/C 小鼠，提前一周用 0.5ml 石蜡油注射到小鼠腹腔，将大约 106 个杂交瘤细胞悬浮在 1ml 无血清 IPMI1640 培养基中，注入小鼠腹腔内。10 天后，待小鼠腹部明显膨大时收集腹水。用正辛酸-硫酸铵沉淀法来纯化腹水。用核酸蛋白紫外扫描仪测定 IgG 的 A278nm/A251 nm 值，并测定 A278nm 的值，根据所得数据初步判断是否为 IgG 球蛋白。

腹水抗体经纯化后，在紫外蛋白分析仪上测得抗体的 A278nm/A251 nm 的值约为 2.5。根据哺乳动物 IgG 的 A278nm/A251 nm 约为 2.5-3.0，而其它蛋白质的这个比值为 1-1.5 的特点，可以初步判定纯化后得到的蛋白为 IgG 蛋白。

根据方阵滴定的原则，在抗原稀释 2000 倍，浓度为 $25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ，抗体稀释约 4000 倍时，吸光值为 1，可以确定抗体最佳工作浓度为 4000 倍。

实施例五、固相间接竞争性 ELISA 检测步骤

1、包被：在 96 微孔板内每孔加入 100ul 包被液（包被抗原用碳酸盐缓冲液溶解），4℃过夜或 37℃温育 2 小时；

2、封闭：取出 96 微孔板，弃去包被液，用 PBST（含 0.05% Tween-20 的磷酸盐缓冲液，下同）洗涤三次，甩干，并在每孔中加入 200ul 封闭液（1% OVA），37℃温育 1 小时；

3、加样：取出酶标板，用 PBST 洗涤三次，甩干，将样品去除悬浮杂质后，与等体积抗体混合液混合，按表一所示注入 96 微孔板内，每孔 100ul，同时，酶标板 G1-G6 孔加入 50ul 的抗体和 50ul 的 PBS，H 行各孔加入 100ul

的 PBS, 37℃温育 2 小时;

4、加酶标 SPA (葡萄球菌 A 蛋白): 取出酶标板, 用 PBST 洗涤, 甩干, 于每孔中加入 100ul 酶标 SPA 稀释液, 37℃温育 45 分钟。

5、加底物液: 取出酶标板, 用 PBST 洗涤三次, 甩干。于每孔中加入现配的底物液, 37℃温育 15 分钟。

6、终止反应: 每孔中加入 50ul 2M 硫酸溶液终止反应。

7、读数, 加硫酸后立即用吸水纸吸干酶标板底部, 将酶标板置于酶标仪上, 在 450nm 波长下, 以 H 行作为空白调零, 测定各孔的 OD 值。

8、设定对照孔 G1-G6 的 OD 值的平均值为 B_0 , 同一样品的重复孔的 OD 值平均值为 B_{yp} (yp 代表不同的样品)。每组数据都以三次重复的平均值为准。各样品测定对应的抑制率为 $I=100\%[(B_0-B_{yp})/B_0]$ 。

9、结果判断, 根据样品 OD 值计算抑制率, 若抑制率 $>20\%$, 表明样品中可能有机磷类农药残留, 需进一步进行仪器确认。

实施时, 所述的抗体可以采用单克隆抗体也可以采用多克隆抗体, 所述的样品可以采用蔬果类或液体质。在本实施例中, 所述的抗体为多克隆抗体, 所述的样品为液体质。

实施案例六: 固相直接检测步骤

1、包被: 在 96 微孔板内每孔加入 100ul 包被抗原稀释液, 4 摄氏度过夜或 37 摄氏度温育 2 小时;

2、封闭: 取出 96 微孔板, 弃去包被液, 用 PBST 洗涤三次, 甩干, 并在每孔中加入 200ul 封闭液, 37 摄氏度温育 1 小时;

3、加样: 取出酶标板, 用 PBST 洗涤三次, 甩干, 将样品用甲醇与水以 5: 95 混合液提取, 提取液浓缩净化处理后与等体积辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗体混合液混合, 按表 4-4 所示注入 96 微孔板内, 每孔 100ul, 同时, 酶标板 H 行各孔加入 100ul 的 PBS, G1-G6 孔加入 50ul 的 SPA 标记抗体和 50ul 的 PBS, 37 摄氏度温育 2 小时;

4、加底物液: 取出酶标板, 用 PBST 洗涤三次, 甩干。于每孔中加入现配的底物液, 37 摄氏度温育 15 分钟。

5、终止反应: 每孔中加入 50ul 2 M 硫酸溶液终止反应。

6、读数, 加硫酸后立即用吸水纸吸干酶标底部, 将酶标板置于酶标

仪上，在 450nm 波长下，以 H 行各孔为空白调零，测定各孔的 OD 值。

7、设定对照孔 G1-G6 的 OD 值的平均值为 B_0 ，同一样品的重复孔的 OD 值平均值为 B_{yp} (y_p 代表不同的样品)。每组数据都以三次重复的平均值为准。各样品测定对应的抑制率为 $I=100\%[(B_0-B_{yp})/B_0]$ 。

8、结果判断，根据样品 OD 值计算抑制率，若抑制率 $>20\%$ ，表明样品中可能有机磷类农药残留，需进一步进行仪器确认。

实施时，所述的抗体可以采用单克隆抗体也可以采用多克隆抗体，所述的样品可以采用蔬果类或液体质。在本实施例中，所述的抗体为单克隆抗体，所述的样品为蔬果类。

表 4 酶标板中的加样实验模型

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	样品 7	样品 8	样品 9	样品 10	样品 11	样品 12
B	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	样品 7	样品 8	样品 9	样品 10	样品 11	样品 12
C	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	样品 7	样品 8	样品 9	样品 10	样品 11	样品 12
D	样品 13	样品 14	样品 15	样品 16	样品 17	样品 18	样品 19	样品 20	样品 21	样品 22	样品 23	样品 24
E	样品 13	样品 14	样品 15	样品 16	样品 17	样品 18	样品 19	样品 20	样品 21	样品 22	样品 23	样品 24
F	样品 13	样品 14	样品 15	样品 16	样品 17	样品 18	样品 19	样品 20	样品 21	样品 22	样品 23	样品 24
G	对照	对照	对照	对照	对照	对照						
H	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白

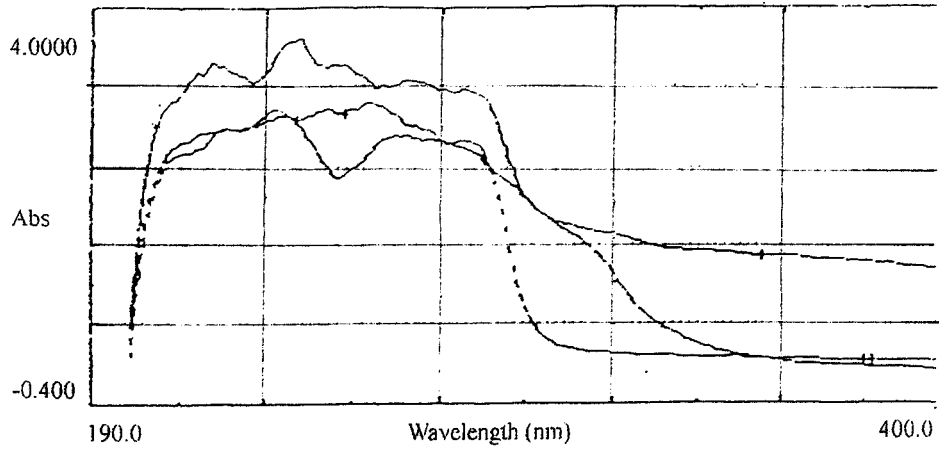
实施例七、免疫检测试制法检测

免疫检测试纸包括：吸水纸 A、玻璃纤维素膜 S、硝酸纤维素膜 T 和硝酸纤维素膜 C 端，免疫检测试纸的具体结构为：依次将吸水纸 A、玻璃纤维素膜 S、硝酸纤维素膜 T 和硝酸纤维素膜 C 之间的接头相互交叉重叠，

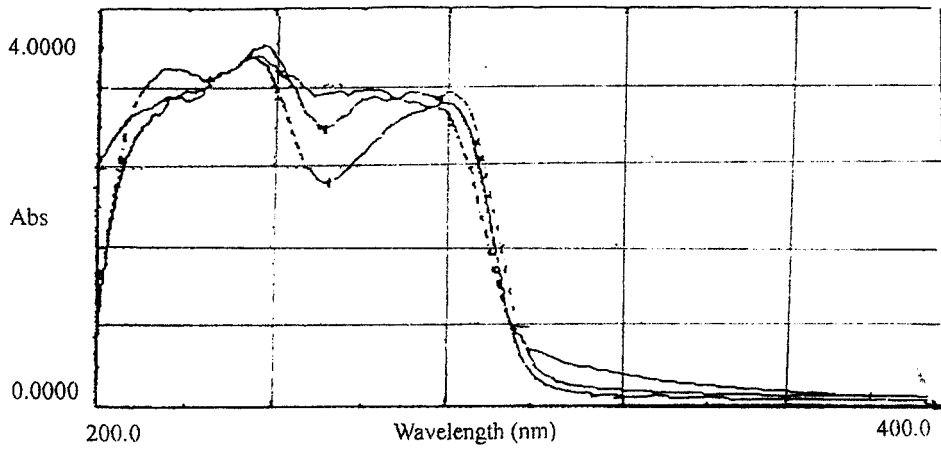
粘贴于塑料片上；玻璃纤维素膜 S 上吸附着对多种有机磷有特异性识别的标记抗体，硝酸纤维素膜 T 包被着线条状的过量抗原，硝酸纤维素膜 C 固定着羊抗兔抗体 IgG。在免疫检测试纸中，以硝酸纤维素膜 T 和硝酸纤维素膜 C 分别为抗原和羊抗兔 IgG 的载体，玻璃纤维素膜 S 为标记抗体的载体，以吸水纸 A 浸取样品液，将定量标记抗体点在玻璃纤维素膜 S 上，再将过量的包被原包被在靠浸样端的硝酸纤维素膜 T 上，作为测试区，羊抗兔 IgG 点在硝酸纤维素膜 C 端，作为对照区。硝酸纤维素膜 T 过量的包被原包被是这样实现的：将硝酸纤维素膜 T 放如 1%牛血清蛋白（BSA）中封闭 30min，然后用磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤 3 次，37℃干燥 3h。

检测时，把吸水纸 A 一端放入到样品液中，样品液在毛细管的作用下向另一端移动，当液体到达玻璃纤维素膜 S 处时，标记抗体被溶解并与样品中抗原反应而形成复合物，液流继续前移至硝酸纤维素膜 T 处，若样品为阴性时，标记抗体有过剩，可再与膜上的抗原结合，加底物有显色反应，多余的标记抗体继续前移至硝酸纤维素膜 C 端，可发生显色反应作对照。相反，当样品为阳性时，测试区域 T 抗原不能结合标记抗体复合物加底物不会有显色反应，复合物继续前移被固定在对照区(C)羊抗兔 IgG 结合，加底物形成显色对照线。若对照区不显色，则说明试纸条失效。

以检测菜样为例，检测前先称取 20g 菜样，加乙腈 50ml 匀浆 1min，抽滤后加 5-7g 氯化钠盐析，其上清液为样品提取液，将试纸条吸水纸 A 端浸入样品液 10s 后取出平放，10min 观察结果，只有对照区显色，表示样品为阴性，测定区显色表示菜样中有农药残留。

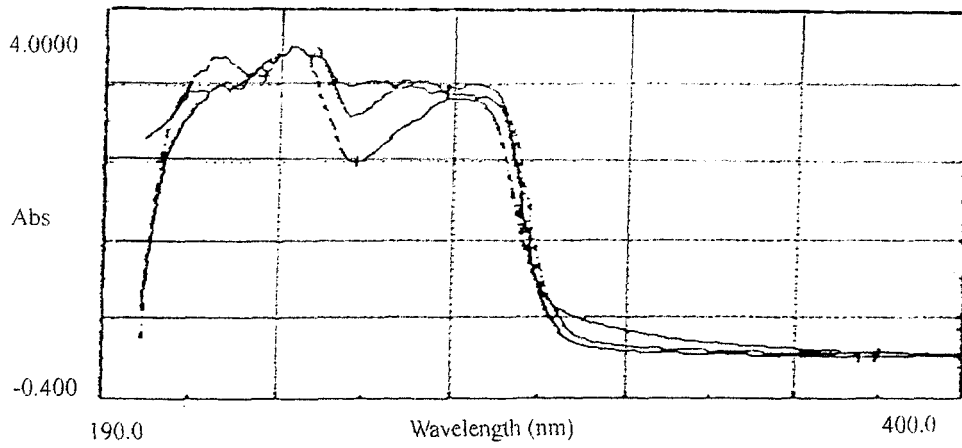


(a)

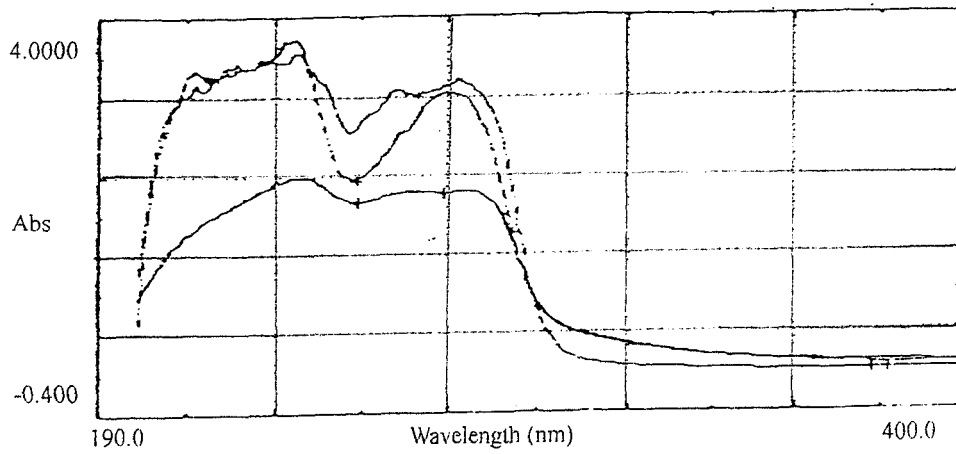


(b)

图 1



(a)



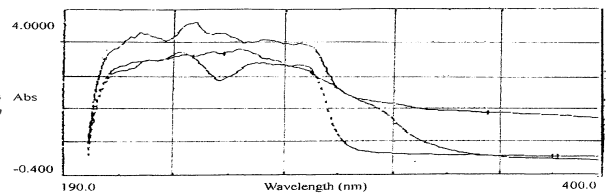
(b)

图 2

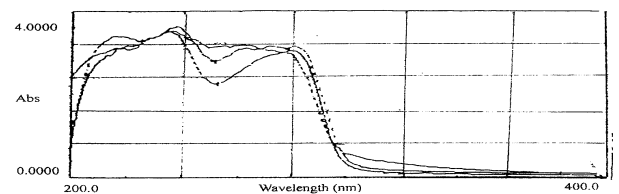
专利名称(译)	用于检测有机磷农药残留的免疫抗体及其应用		
公开(公告)号	CN1598586A	公开(公告)日	2005-03-23
申请号	CN200410041895.X	申请日	2004-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
[标]发明人	刘贤金 颜春荣 余向阳 张存政 王冬兰		
发明人	刘贤金 颜春荣 余向阳 张存政 王冬兰		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/532 G01N33/577		
代理人(译)	孙忠浩		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测有机磷农药残留免疫的抗体及其应用，其特征在于，以二乙基膦酸乙酸为半抗原，通过与牛血清蛋白(BSA)偶联制备成人工免疫原，并通过免疫新西兰大白兔制备成多克隆抗体或通过小鼠免疫、细胞融合、筛选及克隆化培养等过程制成单克隆抗体，所述的多克隆抗体或单克隆抗体可用于间接竞争性ELISA、直接ELISA或免疫试纸对有机磷类农药的残留进行检测。本发明的优点在于：所选择的半抗原具有多种有机磷类农药的通用结构，不需要进行结构改造，即可与蛋白质进行藕连后免疫动物，可用于食品，水源中多种有机磷类农药的筛选检测，充分显示了免疫检测技术的快速、简便的特点。



(a)



(b)