

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/531 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710041977.8

[43] 公开日 2007年11月14日

[11] 公开号 CN 101071134A

[22] 申请日 2007.6.14

[21] 申请号 200710041977.8

[71] 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路800号

[72] 发明人 陆贻通 唐建设 张敏 程国华

[74] 专利代理机构 上海交达专利事务所
代理人 王锡麟 王桂忠

权利要求书2页 说明书9页

[54] 发明名称

硫代乙氧基有机磷类农药残留的免疫抗体制备方法

[57] 摘要

一种硫代乙氧基有机磷类农药残留的免疫抗体制备方法，属于生物免疫技术领域。本发明制备方法具体包括：以对硫磷为反应初始物，在酸和金属锌的共同参与下进行氧化还原反应，得对硫磷还原产物对氨基对硫磷，再与亚硝酸钠在低温下进行重氮化反应后，与牛血清蛋白酪氨酸上羟基的邻位结合，制备成人工免疫原，并免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体。本发明用该抗体建立的酶联免疫吸附分析方法可用于检测硫代乙氧基有机磷类农药残留，方法具有快速、灵敏、廉价以及方便等优点。

1. 一种硫代乙氧基有机磷类农药残留的免疫抗体制备方法，其特征在于，包括步骤如下：

合成人工免疫原，具体步骤如下：

- (1). 对硫磷的还原，还原产物为对氨基对硫磷即人工半抗原；
- (2). 氨基对硫磷的重氮化反应；
- (3). 重氮化产物与牛血清蛋白的连接反应；

制备多克隆抗体，具体步骤如下：

(1). 选择健壮的新西兰大白兔，采血并分离血清：人工合成的免疫原以生理盐水稀释，加等体积的完全佐剂乳化，进行第一次免疫，3周后进行二次免疫，改用不完全佐剂乳化，以后每两周免疫一次，每次免疫后的第8天进行效价测定，采血并分离血清；

(2). 采用辛酸-硫酸铵盐析法纯化抗血清中的 IgG。

2. 如权利要求1所述的硫代乙氧基有机磷类农药残留的免疫抗体制备方法，其特征是，所述的人工半抗原，其合成方法具体为：加对硫磷，按照质量体积比1：12.5加入二氯甲烷，再加入与二氯甲烷等体积的乙酸与盐酸的混合液，使乙酸：盐酸=22：3，称3倍对硫磷质量的锌粉，放入数粒小玻璃珠；接上冷凝回流装置，加热回流，持续2小时-6小时；反应物抽滤后倾入分液漏斗中静置分液，上层水相和酸相以10M的NaOH调pH值至中性，再以二氯甲烷提取数次，合并有机相；下层的有机相以水洗数次后再合并有机相；将合并的有机相以10M的NaOH调pH值至中性，水洗，无水硫酸钠干燥后减压浓缩，得红棕色的油状液体为对氨基对硫磷，即得人工半抗原。

3. 如权利要求1或2所述的硫代乙氧基有机磷类农药残留的免疫抗体制备方法，其特征是，所述的人工半抗原，其设计为将对硫磷还原成对氨基对硫磷。

4. 如权利要求1所述的硫代乙氧基有机磷类农药残留的免疫抗体制备方法，其特征是，所述的氨基对硫磷的重氮化反应，具体是：取对氨基对硫磷，用甲醇溶解后，按照质量体积比1：100加入40mol/L的HCl水溶液，冰浴并搅拌，有

不溶物加入少量 N, N-二甲基甲酰胺促进各物质溶解混合均匀; 滴加 1mol/L 的 NaNO_2 , 随时用淀粉碘化钾试纸检测, 至淀粉碘化钾试纸变蓝色后静置 0.5 小时-1 小时, 加入适量的 1mol/L 的尿素溶液, 以除去过量的 NaNO_2 。

5. 如权利要求 1 所述的硫代乙氧基有机磷类农药残留的免疫抗体制备方法, 其特征是, 所述的重氮化产物与牛血清蛋白的连接反应, 具体是: 将 (2) 反应产物慢慢滴加入牛血清蛋白或鸡卵清蛋白, 其投料摩尔比为对氨基对硫磷: 牛血清蛋白或鸡卵清蛋白=100: 1, 蛋白质用 0.2M, pH=9.0 的硼酸盐缓冲液溶解, 冰浴条件下反应 4 小时-6 小时; 装入透析袋先用蒸馏水透析两天后, 再用 pH=7.0 的磷酸盐缓冲液透析, 直至透析液中没有磷元素检出。

6. 如权利要求 1 所述的硫代乙氧基有机磷类农药残留的免疫抗体制备方法, 其特征是, 所述的进行第一次免疫, 其免疫剂量 0.8 mg/Kg -1.2mg/Kg。

7. 如权利要求 1 所述的硫代乙氧基有机磷类农药残留的免疫抗体制备方法, 其特征是, 所述的辛酸-硫酸铵盐析法, 是指辛酸在偏酸性条件下能将血清中除 IgG 以外的蛋白都沉淀下来, 上清液中只保留 IgG。

8. 如权利要求 1 或 7 所述的硫代乙氧基有机磷类农药残留的免疫抗体制备方法, 其特征是, 所述的辛酸-硫酸铵盐析法, 具体是: 将抗血清溶液搅拌并滴加辛酸溶液, 搅拌 30min, 10000rpm 离心 30min; 上清液用饱和硫酸铵盐析, 5000rpm 离心 15min, 沉淀物以透析液溶解, 再透析。

硫代乙氧基有机磷类农药残留的免疫抗体制备方法

技术领域

本发明涉及的是一种生物免疫技术领域的方法，具体是一种硫代乙氧基有机磷类农药残留的免疫抗体制备方法。

背景技术

农药对控制农作物病、虫、草、鼠等的危害，促进高产优产，保证农业丰收等方面具有着重要的作用。据估计，全国的粮食、水果和蔬菜从生产到储藏过程中，因病、虫、草、鼠等的危害，损失至少 20%-30%，因此，农药在农业生产中是不可缺少的生产资料。21 世纪的农业仍离不开农药，对农药的研究、生产和使用还将继续发展。施用的农药仅有 10-20%附着在作物本体上，其他农药散落在农作物的周边环境。农药在环境及生物体中会得到一定程度的降解，我们把残存在环境中和生物体内的微量农药原体及其各种代谢物和杂质，称作农药残留。农药残留不仅污染环境、危及作物生长，同时最终也通过食物链富集放大至人体内，危及人类健康。已有的研究表明，环境中高残存农药与致癌、至畸、致突变等都具有一定的因果关系。农药已经是环境污染中最主要的成分之一。我国是世界上农药生产和消费的大国，由于大量的使用农药，我国农药中毒的数量也越来越多。有机磷又是目前应用量最大、应用面最广的农药。几十年来，国际上有机磷杀虫剂的销售额一直居各类农药之首，在杀虫剂中也一直占 30%的比例。要预防和处理有机磷农药引起的环境、食品污染等问题，最有效的策略是尽早尽快的监测有机磷并提出相应的对策。因此加强对有机磷农药残留检测方法的研究，对保护生态环境，保障人类健康有着重要的意义。

在过去的几十年里，大量的研究已开发出各种成熟的有机磷检测技术，如气相色谱、高效液相色谱、薄层色谱以及与各种色质联用技术等。尽管这些技术灵敏、准确和可靠，但需要对样品进行繁琐的前处理，耗时，成本高，而且需要昂贵且笨重的仪器，不适用于现场监测。因此开发一种快速、灵敏、可靠，适用

于现场监控的有机磷农药残留检测技术，具有重要的现实意义和使用价值。

免疫分析方法是根据抗农药小分子的抗体与农药分子之间的特异结合所建立的，是一种快速、灵敏、便于操作、费用低的检测方法。而农药分子多为小分子化合物，需要通过与生物大分子如蛋白质偶联后才能具有免疫原性，刺激动物免疫系统产生特异性抗体。由于绝大多数的农药小分子结构不能直接同载体大分子偶联，因此通常人们对农药分子进行改造，以使其具有可与载体蛋白相结合的位点。在我国，有机磷一直作为一类主要的农药品种长期使用。基本上所有有机磷农药分子都不能与蛋白质分子直接偶联，因此必须对有机磷农药分子进行改造从而可以结合载体蛋白。而目前有关此技术的发明专利，基本上是针对某一种有机磷农药分子进行复杂的改造或重新合成，以得到人工半抗原，并以此得到抗特定有机磷农药的抗体。

经对现有技术文献的检索发现，Alcocer 等人在《J. Agric. Food Chem》(农业食品化学)48卷(2000年)2228-2233页上发表的“Use of Phosphonic Acid as a Generic Hapten in the Production of Broad Specificity Anti-Organophosphate Pesticide Antibody” (以二乙基磷丁烯酸为通用半抗原制备抗有机磷农药广谱特异性抗体)，该文提及利用反式-4-(0,0-二乙基磷酰基)-2-丁烯酸作为有机磷农药通用半抗原，制备针对有机磷农药具有广谱特异性的抗体。所得到的多克隆抗体与二甲氧基磷酸酯类及硫代磷酸酯类化合物结合力较弱，对较多农药的检测灵敏度不高。

发明内容

本发明的目的在于克服现有技术之不足，提供一种硫代乙氧基有机磷类农药残留的免疫抗体制备方法。以对硫磷为反应初始物，经过分子改造后，结合载体蛋白用以免疫动物产生多克隆抗体，以及应用这种抗体检测硫代乙氧基有机磷类农药残留方法。具体是，将具有代表性的某类有机磷农药结构小分子，对其进行简单的结构改造，与载体蛋白(牛血清蛋白)偶联制得人工免疫原，并以此获得对硫代乙氧基有机磷类农药具有广谱性的多克隆抗体。

本发明是通过以下技术方案实现的，本发明包括步骤如下：

合成人工免疫原，具体步骤如下：

(1). 对硫磷的还原, 还原产物为对氨基对硫磷即人工半抗原;

(2). 氨基对硫磷的重氮化反应;

(3). 重氮化产物与牛血清蛋白的连接反应;

制备多克隆抗体:

(1). 选择健壮的新西兰大白兔, 采血并分离血清: 人工合成的免疫原以生理盐水稀释, 加等体积的完全佐剂乳化, 进行第一次免疫, 3周后进行二次免疫, 改用不完全佐剂乳化, 以后每两周免疫一次, 每次免疫后的第8天进行效价测定, 采血并分离血清;

(2). 采用辛酸-硫酸铵盐析法纯化抗血清中的 IgG。

所述的人工半抗原的合成方法, 具体为: 加对硫磷, 按照质量体积比 1: 12.5 加入二氯甲烷, 再加入与二氯甲烷等体积的乙酸与盐酸的混合液, 使乙酸: 盐酸=22: 3, 称 3 倍对硫磷质量的锌粉, 放入数粒小玻璃珠; 接上冷凝回流装置, 加热回流, 持续 2 小时-6 小时; 反应物抽滤后倾入分液漏斗中静置分液, 上层水相和酸相以 10M 的 NaOH 调 pH 值至中性, 再以二氯甲烷提取数次, 合并有机相; 下层的有机相以水洗数次后再合并有机相; 将合并的有机相以 10M 的 NaOH 调 pH 值至中性, 水洗, 无水硫酸钠干燥后减压浓缩, 得红棕色的油状液体为对氨基对硫磷, 即得人工半抗原。

所述的人工半抗原设计为将对硫磷还原成对氨基对硫磷。

所述的氨基对硫磷的重氮化反应, 具体是: 取对氨基对硫磷, 用甲醇溶解后, 按照质量体积比 1: 100 加入 40mol/L 的 HCl 水溶液, 冰浴并搅拌, 有不溶物加入少量 N, N-二甲基甲酰胺促进各物质溶解混合均匀; 滴加 1mol/L 的 NaNO₂, 随时用淀粉碘化钾试纸检测, 至淀粉碘化钾试纸变蓝色后静置 0.5 小时-1 小时, 加入适量的 1mol/L 的尿素溶液, 以除去过量的 NaNO₂。

所述的重氮化产物与牛血清蛋白的连接反应, 具体是: 将(2)反应产物慢慢滴加入牛血清蛋白或鸡卵清蛋白, 其投料摩尔比为对氨基对硫磷: 牛血清蛋白或鸡卵清蛋白=100: 1, 蛋白质用 0.2M, pH=9.0 的硼酸盐缓冲液溶解, 冰浴条件下反应 4 小时-6 小时; 装入透析袋先用蒸馏水透析两天后, 再用 pH=7.0 的磷酸盐缓冲液透析, 直至透析液中没有磷元素检出。

所述的进行第一次免疫，其免疫剂量 0.8 mg/Kg -1.2mg/Kg。

所述的辛酸-硫酸铵盐析法，是指辛酸在偏酸性条件下能将血清中除 IgG 以外的蛋白都沉淀下来，上清液中只保留 IgG。

所述的辛酸-硫酸铵盐析法，具体是：将抗血清溶液搅拌并滴加辛酸溶液，搅拌 30min, 10000rpm 离心 30min; 上清液用饱和硫酸铵盐析, 5000rpm 离心 15min, 沉淀物以透析液溶解，再透析。

所述 IgG 抗体用于对硫代乙氧基有机磷类农药的残留进行检测。

所述的硫代乙氧基有机磷类农药包括：乙基溴硫磷、毒死蜱、蝇毒磷、二嗪农、嘧啶磷、对硫磷、异柳磷、辛硫磷。

本发明多克隆抗体可用于常规的间接竞争 ELISA 方法检测，或酶、荧光标记抗体后用于直接 ELISA 检测，或直接用抗体进行荧光偏振免疫分析测定。

本发明的抗体可用于检测食品、土壤、水等环境样品中硫代乙氧基有机磷类农药残留量的检测。

本发明的有益效果：是通过采用还原对硫磷农药分子最适的制备硫代乙氧基有机磷类农药通用型人工免疫原，并以此获得对此类农药具有广谱性的多克隆抗体，用以对食品、土壤、水等环境中此类有机磷农药的快速筛选检测，方法具有灵敏、快速、方便、费用低等优点。

具体实施方式

下面对本发明的实施例作详细说明：本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施，给出了详细的实施方式和具体的操作过程，但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

实施例 1

首先，人工免疫原的制备：

将 2g 对硫磷溶解在 20mL 经过蒸馏的二氯甲烷中，用 4℃浓度为 10g/L 的 Na₂CO₃ 溶液洗涤 3 次，每次 5mL，洗过的对硫磷溶液倾入 100mL 的圆底烧瓶中，加入 12.5mL 经过蒸馏的二氯甲烷，再加入 12.5mL 乙酸与盐酸的混合液（乙酸 11mL+盐酸 1.5mL），称 6g 锌粉加入圆底烧瓶中，放入数粒小玻璃珠。在圆底烧瓶的上面接上冷凝回流装置，加热回流，持续 4 小时。反应物抽滤后倾入分液漏

斗中静置分液，上层水相和酸相以 10M 的 NaOH 调 pH 值至中性，再以二氯甲烷提取数次，合并有机相。下层的有机相以水洗数次后再合并有机相。将合并的有机相以 10M 的 NaOH 调 pH 值至中性，再以水洗数次，无水硫酸钠干燥后减压浓缩，得红棕色的油状液体约 1.5g。

称取 0.25g 上述红棕色的油状液于 100mL 的圆底烧瓶中，用数滴甲醇溶解后，加入 40mol/L 的 HCl 水溶液 25mL，冰浴并搅拌，有不溶物加入少量 N，N-二甲基甲酰胺（DMF）促进各物质溶解混合均匀。滴加冷的 1mol/L 的 NaNO₂，随时用淀粉 KI 试纸检测，至淀粉 KI 试纸变蓝色后静置 1 小时，加入适量的 1mol/L 的尿素溶液，以除去没有反应的过量 NaNO₂。

0.25g BSA 溶解于 5mL，0.2M，pH=9.0 的硼酸盐缓冲液中，或 0.17g OVA 溶解于 5mL，0.2M，pH=9.0 的硼酸盐缓冲液中，慢慢滴加入上述反应液（每次加 200 μL），冰浴条件下充分搅拌 5 小时。装入透析袋先用蒸馏水透析两天后，再用 pH=7.0 的磷酸盐缓冲液透析，直至透析液中没有磷元素检出。

接着，多克隆抗体制备：

根据上述方法制备的免疫原免疫 2 只新西兰大白兔，具体免疫方法如下：选择约 2Kg 体重的新西兰大白兔，采集阴性血清。人工合成的免疫原以生理盐水稀释，加等体积的弗氏完全佐剂（首免）乳化，免疫剂量 0.8 mg/Kg，背部皮下多点注射。3 周后进行二免，改用弗氏不完全佐剂乳化，方法同首免。以后每两周免疫一次，每次免疫后的第 8 天进行效价测定。第 4 次免疫采用背部皮下多点注射结合耳静脉注射。当效价达到最佳时，采血并分离血清。

本实施例采用心脏采血法。采血后先待收集在大培养皿中的血液凝固后，然后用接种针沿培养皿边缘将血块与玻璃脱离，放置于 37℃ 恒温箱中 1 小时，吸取上透明血清，再放入 4℃ 冰箱中 4 小时。待血块收缩后没，用移液枪将血清吸出，以 3000rpm 离心 20 分钟，再吸出透明血清。

免疫程序结束后，血清经适当稀释后用酶联免疫吸附测定（ELISA）方法测定效价，待 8 次免疫后抗血清效价最高，两只动物血清效价分别达到 1：20000，1：16000。

抗体的纯化方法采用辛酸-硫酸铵盐析法。抗血清溶液搅拌滴加辛酸溶液，

搅拌 30min, 10000rpm 离心 30min。上清液用饱和硫酸铵盐析, 5000rpm 离心 15min, 沉淀物以透析液溶解, 透析。

本实施例的固相间接竞争 ELISA 检测步骤:

1. 包被: 在 96 微孔板中每孔加入 100 μ L 包被原(包被原用碳酸盐缓冲液溶解 pH=9.6), 4 过夜或 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。

2. 封闭: 取出 96 微孔板, 弃去包被液, 用含 0.05%Tween-20 的磷酸盐缓冲液(PBST), 洗涤三次, 甩干, 并在每孔中加入 200 μ L 封闭液(5%脱脂奶), 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。

3. 加样: 取出酶标板, 用 PBST 洗涤 3 次甩干, 将样品去除悬浮杂质后, 与第体积抗体混合液混合, 加入 96 孔酶标板内, 每孔 100 μ L, 同时酶标板中设置以磷酸盐缓冲液(PBS)代替抗体的空白对照, 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。

4. 加酶标二抗: 羊抗兔辣根过氧化物标记抗体用 PBS 稀释 10000 倍, 每孔加 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。

5. 加底物: 每孔加底物 3, 3', 5, 5' -四甲基联苯胺-过氧化氢溶液 100 μ L, 反应 30min。有二抗被结合在酶标板上就会显出蓝色。

6. 终止: 每孔加 50 μ L 2M H₂SO₄ 终止。加底物后又蓝色的孔终止后就显黄色。

7. 读数: 将酶标板在酶标仪上测 450nm 波长下的吸光值。

采用方阵滴定法, 对包被原系列梯度稀释包被过夜, 对每一种浓度的包被原, 都以不同浓度梯度的抗体反应, 测定最佳的包被原和抗体工作浓度。

加样步骤中, 将样品以系列浓度稀释的对硫磷代替, 测得的数值以四参数对数方程 $y = \{ (A-D) / [1 + (x/C)^B] \} + D$ 模拟。其中 A 代表无被分析农药的最大吸光值; B 代表曲线拐点的斜率; C 代表 50%抑制率的农药浓度; D 为最大分析物浓度的最小吸光值。交叉反应率计算公式为 (参照农药 I50/测试农药 I50) $\times 100\%$ 。本实施例对农药的检测情况如下:

| 农药种类 | I50 (μ g/mL) |
|------|-------------------|
| 对硫磷 | 0.65 |
| 毒死蜱 | 0.59 |

| | |
|-------|-------|
| 二嗪农 | 6.24 |
| 辛硫磷 | 19.68 |
| 三唑磷 | 4.13 |
| 乙基溴硫磷 | 29.98 |
| 异柳磷 | 75.33 |

实施例 2

首先，人工免疫原的制备

将 1.33g 对硫磷溶解在 15mL 经过蒸馏的二氯甲烷中，用 4℃浓度为 10g/L 的 Na₂CO₃ 溶液洗涤 3 次，每次 5mL，洗过的对硫磷溶液倾入 100mL 的圆底烧瓶中，加入 8mL 经过蒸馏的二氯甲烷，再加入 12.5mL 乙酸与盐酸的混合液（乙酸 11mL+盐酸 1.5mL），称 4g 锌粉加入圆底烧瓶中，放入数粒小玻璃珠。在圆底烧瓶的上面接上冷凝回流装置，加热回流，持续 2 小时。反应物抽滤后倾入分液漏斗中静置分液，上层水相和酸相以 10M 的 NaOH 调 pH 值至中性，再以二氯甲烷提取数次，合并有机相。下层的有机相以水洗数次后再合并有机相。将合并的有机相以 10M 的 NaOH 调 pH 值至中性，再以水洗数次，无水硫酸钠干燥后减压浓缩，得红棕色的油状液体约 0.7g。

氨基对硫磷的重氮化和与蛋白的偶联同实施例 1。淀粉碘化钾试纸变蓝色后静置 0.5 小时，蛋白与重氮化氨基对硫磷结合时间为 4 小时。

接着，多克隆抗体制备

将制备的免疫原免疫 2 只新西兰大白兔，具体免疫方法同实施例一，免疫剂量设为 1.2mg/Kg，获得血清效价分别为 1: 24000，1: 20000。

抗体的纯化方法采用辛酸-硫酸铵盐析法。辛酸在偏酸性条件下能将血清中除 IgG 以外的蛋白都沉淀下来，上清液中只保留 IgG。

本实施例的固相间接竞争 ELISA 检测步骤同实施例 1。本实施例对农药的检测情况如下：

| | |
|------|-------------|
| 农药种类 | 150 (μg/mL) |
| 对硫磷 | 0.23 |

| | |
|-------|------|
| 毒死蜱 | 0.34 |
| 二嗪农 | 0.29 |
| 辛硫磷 | 1.85 |
| 三唑磷 | 3.91 |
| 乙基溴硫磷 | 12.6 |
| 异柳磷 | 25.1 |

实施例 3

除对硫磷还原回流时间为 6 小时和蛋白与重氮化氨基对硫磷结合时间 6 小时外，人工免疫原的制备以及多克隆抗体制备步骤均同实施例 1。

本实施例的固相直接竞争 ELISA 检测步骤如下：

1. 包被：在 96 微孔板中每孔加入 100 μ L 抗血清(包被原用碳酸盐缓冲液溶解 pH=9.6)，4 过夜或 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。

2. 封闭：取出 96 微孔板，弃去包被液，用含 0.05%Tween-20 的磷酸盐缓冲液(PBST)洗涤三次，甩干，并在每孔中加入 200 μ L 封闭液(5%脱脂奶)，37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。

3. 加样：取出酶标板，用 PBST 洗涤 3 次甩干，将样品去除悬浮杂质后，与第体积抗体混合液混合，加入 96 孔酶标板内，每孔 50 μ L，同时酶标板中设置以 PBS 代替抗体的空白对照，再加每孔 50 μ L 的辣根过氧化物酶-对硫磷结合物。37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时后再用 PBST 洗涤 3 次。

4. 加底物：每孔加底物 TMB-过氧化氢溶液 100 μ L，反应 30min。辣根过氧化物酶-对硫磷结合物残留在酶标板上就会显出蓝色。

5. 终止：每孔加 50 μ L 2M H₂SO₄ 终止。加底物后又蓝色的孔终止后就显黄色。

6. 读数：将酶标板在酶标仪上测 450nm 波长下的吸光值。

加样步骤中，将样品以系列浓度稀释的对硫磷代替，测得数值以四参数对数方程 $y = \{ (A-D) / [1 + (x/C)^B] \} + D$ 模拟。其中 A 代表无被分析农药的最大吸光值；B 代表曲线拐点的斜率；C 代表 50%抑制率的农药浓度；D 为最大分析物浓

度的最小吸光值。交叉反应率计算公式为(参照农药 I50/测试农药 I50) × 100%。

本实施例抗体对农药的检测情况如下：

| 农药种类 | I50 (μg/mL) |
|-------|-------------|
| 对硫磷 | 0.45 |
| 毒死蜱 | 0.72 |
| 二嗪农 | 4.64 |
| 辛硫磷 | 36.48 |
| 三唑磷 | 9.23 |
| 乙基溴硫磷 | 4.7 |
| 异柳磷 | 101.71 |

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 硫代乙氧基有机磷类农药残留的免疫抗体制备方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN101071134A | 公开(公告)日 | 2007-11-14 |
| 申请号 | CN200710041977.8 | 申请日 | 2007-06-14 |
| [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 | 陆贻通 唐建设 张敏 程国华 | | |
| 发明人 | 陆贻通 唐建设 张敏 程国华 | | |
| IPC分类号 | G01N33/531 | | |
| 代理人(译) | 王锡麟 王桂忠 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

一种硫代乙氧基有机磷类农药残留的免疫抗体制备方法，属于生物免疫技术领域。本发明制备方法具体包括：以对硫磷为反应初始物，在酸和金属锌的共同参与下进行氧化还原反应，得对硫磷还原产物对氨基对硫磷，再与亚硝酸钠在低温下进行重氮化反应后，与牛血清蛋白酪氨酸上羟基的邻位结合，制备成人工免疫原，并免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体。本发明用该抗体建立的酶联免疫吸附分析方法可用于检测硫代乙氧基有机磷类农药残留，方法具有快速、灵敏、廉价以及方便等优点。

| | |
|-------|-------|
| 二嗪农 | 6.24 |
| 辛硫磷 | 19.68 |
| 三唑磷 | 4.13 |
| 乙基溴硫磷 | 29.98 |
| 异柳磷 | 75.33 |