

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

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 200410065109. X

[43] 公开日 2005 年 6 月 8 日

[11] 公开号 CN 1624482A

[22] 申请日 2004. 10. 20

[21] 申请号 200410065109. X

[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 冯大和 邵秀金

[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 氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒

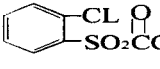
[57] 摘要

本发明涉及氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒。合成氯黄隆半抗原(见化学式)并与蛋白质共价偶联制备人工抗原与包被原,以人工抗原免疫动物获得对氯黄隆具特异性亲和力的抗体,用辣根过氧化物酶标记半抗原和抗体,用包被原或抗体包被微孔板,加入待测样品(或氯黄隆标样)与酶标记物的混合液,氯黄隆、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,洗涤去除游离物,加入酶的底物和显色剂,酶促显色反应强度与样品(或标样)中氯黄隆的含量成反比,据此建立氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析技术。运用该技术,在盒内设置相关试剂与材料,制备免疫检测试剂盒,用于土壤、水等样本中残留氯黄隆的快速检测。




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

1、一种用于氯黄隆快速检测的直接竞争酶联免疫吸附分析方法

及其试剂盒，其特征是以  为半抗原，与牛血清白蛋白、卵清蛋白等不同蛋白质共价偶联成人工抗原和包被原，以人工抗原免疫动物制备对氯黄隆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，加入待测样品或氯黄隆标样与酶标记物的混合液，氯黄隆、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，与样品或标样中氯黄隆的含量成反比，从而建立氯黄隆酶联免疫吸附分析技术并应用该技术制备氯黄隆免疫检测试剂盒。

2、根据权利要求 1 所述氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒，其特征是所述氯黄隆半抗原是以邻氯苯磺酰胺为起始原料，与琥珀酸酐反应合成的 N-(2-氯苯磺酰基)单琥珀酰亚胺酸，其

分子结构式为 .

3、根据权利要求 1 所述氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒，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 所述氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒，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、鼠等动物制备的对氯黄隆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和力的单克隆抗体。

5、根据权利要求 1 所述氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒，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 所述氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒，其特征是以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。

7、根据权利要求 1 所述氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒，其特征是所述酶的底物为过氧化脲或过氧化氢。所述显色剂为 3', 3', 5', 5' -四甲基联苯胺 (TMB) 或邻苯二胺 (OPD)。

8、根据权利要求 1、2、3、4、5、6、7 所述氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒，其特征是所述试剂盒由盒体、置于盒体内的可拆卸式聚苯乙烯微孔板、包被原或对氯黄隆具特异性亲和力的抗体、碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、封闭液、氯黄隆标样、酶标记物、底物液、显色剂、终止液和使用说明书组成。

氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒

技术领域

本发明涉及氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒，主要应用于土壤、水、植物中残留氯黄隆的快速检测，也可用于农药原药和制剂中氯黄隆的快速鉴定。

技术背景

氯黄隆是美国杜邦公司 1982 年研制开发的第一个商品化磺酰脲类除草剂，其用量仅为 15~30g/hm²，比传统除草剂的除草效率提高 100~1000 倍，主要用于防治小麦田中多种禾本科杂草和阔叶杂草，对许多一年生或多年生杂草、尤其是阔叶杂草有特效，它的问世标志着除草剂进入了超高效时代。

虽然氯黄隆单位面积用量很少，但在土壤中残留期较长（半衰期 1~3 个月），对敏感作物的致害浓度极低。土壤中氯黄隆含量达 0.5μg/kg，即可抑制油菜、玉米、大豆、棉花等敏感作物的生长。土壤中氯黄隆含量达 0.3mg/kg，可能对许多双子叶作物甚至水稻秧苗产生严重药害，残留氯黄隆对麦后茬作物产生药害的事件屡有报道。因此，加强土壤和水中残留氯黄隆的监测，对科学合理地使用氯黄隆，保障农作物的安全生产和农业的丰收具有重要意义。

由于氯黄隆的使用量少，农业生产环境中氯黄隆的含量甚微，对土壤等复杂样本中残留氯黄隆的检测需要极高的灵敏度和选择性。

目前已报道的残留氯黄隆的检测方法有衍生化气相色谱法、高效液相色谱法、毛细管电泳法和敏感植物生物测定法等。理化测定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，样品前处理过程复杂、

速度慢、选择性差，微量的目标分析物难以检出。生物测定时间长、影响因素多、无法定性。因此，需要研究开发可以适应大量样本快速检测、特异性强、灵敏度高的残留氯黄隆检测新技术。

发明内容

本发明的目的是提供一种特异性强、灵敏度高、适合环境和生物样本中残留氯黄隆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、适合环境和生物样本中残留氯黄隆现场快速检测的酶联免疫吸附分析试剂盒。

实现本发明的技术方案是：合成氯黄隆半抗原



并与牛血清白蛋白、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，以人工抗原免疫动物制备对氯黄隆具有特异性亲合力的抗体，将所述半抗原和抗体分别与辣根过氧化物酶共价偶联制备酶标半抗原和酶标抗体。用包被原或抗体包被聚苯乙烯微孔板，加入待测样品（或氯黄隆标样）与酶标记物的混合液，氯黄隆、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，洗涤去除未结合的游离物，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）中氯黄隆的含量成反比，从而建立氯黄隆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（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）、氯黄隆标样、酶标抗体或酶标半抗原、底物液、显色剂、终止液和使用说明书，制备氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析试剂盒。

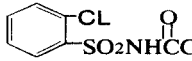
本发明的科学性强、技术先进、应用方法简单。本发明的基本依据是小分子化合物免疫分析化学原理和技术。分子量小于 5000 道尔顿的化合物一般不具备免疫原性，将氯黄隆分子特异性部分以半抗原的形式与不同

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氯黄隆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氯黄隆具特异性亲合力的抗体和氯黄隆半抗原，用包被原或对氯黄隆具特异性亲合力的抗体包被聚苯乙烯微孔板，加入待测样品（或氯黄隆标样）与酶标记物的混合液，氯黄隆、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）中氯黄隆的含量成反比，据此建立氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析技术。运用该技术，在盒内设置相关试剂与材料，制备氯黄隆免疫检测试剂盒，适合环境和生物样本中残留氯黄隆的现场快速检测。试剂盒对氯黄隆检测的线性浓度范围是 10^{-2} ~ 10^1 $\mu\text{g/mL}$ ，检测限 1ng/mL 。通过参看说明书，专业人员可以现场检测操作，一般工作人员也可以进行现场检测分析，便于推广使用。

具体实施方式

一、氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析技术实施例

以邻氯苯磺酰胺为起始原料，与琥珀酸酐反应合成 N-(2-氯苯磺酰基)

单琥珀酰亚胺酸 ，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、鼠等动物制备对氯黄隆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氯黄隆具有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

（或氯黄隆标样）与酶标记物的混合液，氯黄隆、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，洗涤去除未结合的游离物，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）中氯黄隆的含量成反比，据此建立氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析技术，对待测样品中的氯黄隆进行定性定量快速检测。

二、氯黄隆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 μ L/孔，4 $^{\circ}$ C 吸附过夜。去除孔中的溶液，拍干，加入封闭液，150 μ 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 NaN_3 溶解，定容至 1000mL。

3. 氯黄隆标样溶液的配制 准确称取氯黄隆标样 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氯黄隆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% 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氯黄隆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 2g NaN_3 溶于 280 mL 0.2mol/L NaH_2PO_4 与 720 mL 0.2mol/L Na_2HPO_4 的混合液。

7. 封闭液的配制 5.0g 明胶、0.5g NaN_3 溶于 0.01mol/L、pH7.2 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 N_2 或减压脱气，4℃保存。

10. 终止液的配制 100 mL 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 (或对氯黄隆具特异性亲合力的抗体) 适量/瓶、氯黄隆标样 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，包被原或对氯黄隆具特异性亲合力的抗体、氯黄隆标样溶液、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 (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)、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。试剂盒检验合格后封装，4℃保存。

专利名称(译)	氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒		
公开(公告)号	CN1624482A	公开(公告)日	2005-06-08
申请号	CN200410065109.X	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 冯大和 邵秀金		
发明人	刘曙照 冯大和 邵秀金		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/535 G01N33/547		
代理人(译)	胡定华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒。合成氯黄隆半抗原(见化学式)并与蛋白质共价偶联制备人工抗原与包被原,以人工抗原免疫动物获得对氯黄隆具特异性亲合力的抗体,用辣根过氧化物酶标记半抗原和抗体,用包被原或抗体包被微孔板,加入待测样品(或氯黄隆标样)与酶标记物的混合液,氯黄隆、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,洗涤去除游离物,加入酶的底物和显色剂,酶促显色反应强度与样品(或标样)中氯黄隆的含量成反比,据此建立氯黄隆直接竞争酶联免疫吸附分析技术。运用该技术,在盒内设置相关试剂与材料,制备免疫检测试剂盒,用于土壤、水等样本中残留氯黄隆的快速检测。

