



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102175865 A

(43) 申请公布日 2011.09.07

(21) 申请号 201010611129.8

G01N 33/535(2006.01)

(22) 申请日 2010.12.29

(71) 申请人 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街12号

(72) 发明人 金茂俊 王静 邵华 金芬

(74) 专利代理机构 哈尔滨市松花江专利商标事务所 23109

代理人 韩未洙

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/545(2006.01)

G01N 33/546(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 1 页

(54) 发明名称

三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备和使用方法

(57) 摘要

三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备和使用方法,它涉及三唑磷分析测定试剂盒及其制备和使用方法。本发明解决了现有的直接竞争酶联免疫吸附分析方法的最低检出限高的技术问题。三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒由三唑磷标准品、包被三唑磷单克隆抗体的载体、辣根过氧化物酶标记的三唑磷半抗原、化学发光增敏液和 PBST 缓冲液组成;制备:将配制的三唑磷标准品、三唑磷单克隆抗体包被的载体、化学发光增敏液和缓冲液装入盒子,得到试剂盒。使用:将三唑磷标准品和样品分别加入载体反应孔中,洗涤后加化学发光增敏液,测定发光强度,绘标准曲线,查出样品中的三唑磷浓度。本发明三唑磷最低检测限 0.06ng/mL,可用于食品领域。

1. 三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒,其特征在于三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒由三唑磷标准品、包被有三唑磷单克隆抗体的固相载体、辣根过氧化物酶标记的三唑磷半抗原、化学发光增敏液和浓度为 0.01mol/L 的 pH 值为 7.4 的 PBST 缓冲液组成;其中三唑磷标准品由一个空白样和三唑磷浓度分别为从 0.01ng/mL ~ 2.5ng/mL 中选取的 6 ~ 8 个值的样品组成;化学发光增敏液是按化学发光底物的浓度为 0.5mmol/L ~ 3mmol/L、对碘苯酚的浓度为 0.1mmol/L ~ 1mmol/L、过氧化氢的浓度为 1mmol/L ~ 10mmol/L,以浓度为 0.1mol/L、pH 值为 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液为稀释液配制而成的溶液,其中化学发光底物为鲁米诺、异鲁米诺或 7-氨基-6-巯基邻苯二甲酰肼。

2. 根据权利要求 1 所述的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒,其特征在于所述固相载体为微孔板、塑料珠、塑料管或磁性颗粒。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒,其特征在于三唑磷标准品中三唑磷浓度分别为从 0.02ng/mL ~ 2.4ng/mL 中选取的 7 个值。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒,其特征在于化学发光增敏液中化学发光底物的浓度为 0.8mmol/L ~ 2.7mmol/L,对碘苯酚的浓度为 0.2mmol/L ~ 0.9mmol/L,过氧化氢的浓度为 2mmol/L ~ 8mmol/L。

5. 如权利要求 1 所述的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒的制备方法,其特征在于三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒的制备方法按以下步骤进行:一、以三唑磷配制三唑磷标准品:按三唑磷的浓度为从 0.01ng/mL ~ 2.5ng/mL 中选取的 6 ~ 8 个值配制三唑磷溶液,分装,取各浓度的三唑磷溶液和一个空白样组成一组,得到三唑磷标准品;二、以三唑磷单克隆抗体包被固相载体:a、将三唑磷单克隆抗体加入到浓度为 0.05mol/L 的 pH 值为 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液中,并混合均匀,其中三唑磷单克隆抗体的浓度为 4 μ g/mL ~ 20 μ g/mL,得到包被液;b、将步骤 a 制备的包被液负载于固相载体上,接着将固相载体置于温度为 36 $^{\circ}$ C ~ 38 $^{\circ}$ C、相对湿度为 60% ~ 80% 的恒温恒湿培养箱中温育 2h,然后用 0.01M、pH 值为 7.4 的 PBST 缓冲液洗涤固相载体;c、将胰蛋白胍和生物防腐剂加入到 0.05mol/L 的 pH 值为 7.0 ~ 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液中,并混合均匀,其中胰蛋白胍与 Tris-HCl 缓冲液的质量体积比为 1g : 50mL ~ 100mL,生物防腐剂与 Tris-HCl 缓冲液的体积比为 1 : 1000 ~ 2000,得到封闭液;d、将步骤 c 得到的封闭液负载于步骤 b 处理后的固相载体上,得到以三唑磷单克隆抗体包被的固相载体;三、以辣根过氧化物酶标记三唑磷半抗原:e、量取辣根过氧化物酶和浓度为 0.01mol/L 的碳酸盐缓冲溶液,并将辣根过氧化物酶加入到碳酸盐缓冲溶液中,混合均匀,其中辣根过氧化物酶与碳酸盐缓冲溶液的质量体积比为 5mg : 1mL,得到辣根过氧化物酶溶液;f、按三唑磷半抗原的浓度为 0.25mmol/L、正三丁胺的浓度为 0.25mmol/L 和氯甲酸乙酯的浓度为 0.25mmol/L 称取三唑磷半抗原、正三丁胺、氯甲酸乙酯和二甲基甲酰胺,将三唑磷半抗原溶于二甲基甲酰胺中,然后在搅拌的条件下,加入正三丁胺和氯甲酸乙酯,加完后在室温下搅拌反应 1h,得到反应液;g、按步骤 f 得到的反应液与步骤 e 得到的辣根过氧化物酶溶液的体积比为 1 : 20,将反应液逐滴滴入到辣根过氧化物酶溶液中,室温搅拌反应 2h ~ 3h 后,装入透析袋,用蒸馏水和磷酸盐缓冲液透析,透析结束后,将透析袋中纯化液体取出,再加入与纯化液体体积相等的甘油和占纯化液体体积 0.16% ~ 0.2% 的生物防腐剂,混合均匀,分装后于 0 ~ 4 $^{\circ}$ C 保存,得到以辣根过氧化物酶标记三唑磷半抗原;四、配制化学发光增敏液:h、将化学发光底物加入到 0.1mol/L 的 NaOH 溶

液中,得到浓度为 12.5mmol/L 的化学发光底物母液 ;i、将对碘苯酚加入到去离子水,得到 3mmol/L 的对碘苯酚母液 ;j、配制浓度为 0.1mol/L、pH 值为 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液,然后以该 Tris-HCl 缓冲液为稀释液,按化学发光底物浓度在 0.5mmol/L ~ 3mmol/L,对碘苯酚浓度在 0.1mmol/L ~ 1mmol/L,过氧化氢浓度在 1mmol/L ~ 10mmol/L,将步骤 h 制备的化学发光底物母液,步骤 i 制备的对碘苯酚母液,浓度为 30% (质量) 的过氧化氢溶液加入到 Tris-HCl 缓冲液中,混合均匀,得化学发光增敏液 ;五、配制并分装 PBST 缓冲液 ;六、将步骤一制备的三唑磷标准品、步骤二制备的三唑磷单克隆抗体包被的固相载体、步骤三制备的化学发光增敏液、步骤四制备的化学发光增敏液和步骤五制备的缓冲液装入一个盒子中,得到三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒。

6. 根据权利要求 5 所述的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒的制备方法,其特征在于步骤二的 c 中生物防腐剂为叠氮钠。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒的制备方法,其特征在于步骤三的 g 中所述的透析是将透析袋浸入蒸馏水中保持 4h ~ 8h,用蒸馏水透析 3 次,然后用 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液透析 3 天,每天更换透析液 3 ~ 4 次。

8. 根据权利要求 5 或 6 所述的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒的制备方法,其特征在于步骤五中 PBST 缓冲液的配制方法为:称取 0.27gKH₂PO₄、1.14g 无水 Na₂HPO₄、8.0gNaCl 和 0.2gKCl,用双蒸水定容至 1L,得溶液,再加入占溶液总质量 0.05% 的吐温 20,混合均匀即得到 PBST 缓冲液。

9. 如权利要求 1 所述的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒的使用方法,其特征在于三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒的使用方法按以下步骤进行:一、将三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒取出,在室温下平衡 10min ~ 15min ;二、在三唑磷单克隆抗体包被的固相载体的反应孔中分别加入各浓度的三唑磷标准品和经前处理后得到的被测样品各 50 μL,设置一个重复,然后每个反应孔加入以辣根过氧化物酶标记三唑磷半抗原 50 μL,用微量振荡器振荡混匀,然后置于温度为 37℃,相对湿度为 70% 的恒温恒湿培养箱中温育 1h ;三、用 PBST 缓冲液洗涤 3 次 ;四、各反应孔中加入化学发光增敏液 200 μL,用微量振荡器振荡混合均匀,在温度为 20℃ ~ 25℃ 的条件下避光反应 5 分钟 ;五、用化学发光测定仪测定各反应孔发光强度 ;六、以三唑磷标准品的浓度为横坐标,各浓度所对应的发光强度抑制率为纵坐标,建立标准曲线,并根据标准曲线计算样品中的三唑磷浓度。

10. 根据权利要求 9 所述的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒的使用方法,其特征在于步骤二中被测样品的前处理的方法按以下步骤进行:m、将待测样品切块后放在均质机中,均质后得到均质液;n、再按均质液与乙腈的质量体积比为 1g : 1mL ~ 2mL、均质液与硫酸镁的质量比为 2.5 : 0.9 ~ 1.2、均质液与氯化钠的质量比为 10 : 0.9 ~ 1.1 称取步骤 m 得到的均质液、乙腈、硫酸镁和氯化钠,先将均质液加入到乙腈中,振荡提取 1min ~ 2min,然后再加入硫酸镁和氯化钠,再振摇 1min ~ 2min,得到混合液;o、将步骤 n 得到的混合液在转速为 3000rpm ~ 4000rpm 的条件下离心分离 5min ~ 8min,吸取上清液;p、按上清液与 0.05mol/L、pH 值为 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液的体积比为 1 : 1 ~ 4,甲醇与 0.05mol/L、pH 值为 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液的体积比为 1 : 9 ~ 11 量取步骤 o 得到的上清液、0.05mol/L、pH 值为 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液和甲醇,先将上清液加入洁净的容器中,用氮气流吹干,再将 Tris-HCl 缓冲液和甲醇加入到上述的容器中,旋涡震荡 1min ~ 2min,完成前处理。

三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及三唑磷分析测定试剂盒及其制备和使用方法。

背景技术

[0002] 随着高毒农药品种将逐步从市场退出,三唑磷已成为替代甲胺磷农药的主要品种,广泛用于长江中下游流域水稻二化螟的防治。近年来其使用量迅速增加,在三唑磷农药在我国正进入市场旺季的同时,国外已经开始限制或禁止三唑磷农药的使用与销售。2004年11月28日,国家质检总局发布紧急预警,称欧盟于12月31日起正式禁止320种农药在欧盟销售。其中涉及中国正在生产、使用以及出口的农药达60多个品种,其中就包括了三唑磷农药。其他国家和地区对三唑磷的最大残留限量也提出了越来越严格的标准:日本规定稻米中三唑磷的最大残留限量(MRL)为不得检出;欧盟除茶叶为0.05mg/kg、棉籽0.1mg/kg外,其余样品为0.02mg/kg;我国三唑磷的最大残留限量一般都限定为0.05mg/kg。因此,加强三唑磷检测方法学研究对于保障我国食品安全和农产品贸易具有重要意义。

[0003] 现有的三唑磷的检测方法有气相色谱、液相色谱及公开号为CN1624481A的中国专利公开的直接竞争酶联免疫吸附分析的方法,其中的气相色谱和液相色谱分析方法需要昂贵的设备和经过专门训练的操作人员;而直接竞争酶联免疫吸附分析方法的原理为酶的底物在辣根过氧化物酶(HRP)催化作用下产生有色产物,在一定的农药物质的量范围内,农药物质的量与有色产物的光密度(OD)值呈一定的比例关系,从而达到定量的目的。该分析方法因为其光吸收检测的特点使在实际样品检测中样品中存在的外源性物质会对光密度(OD)值产生影响,其最低检出限为0.6ng/mL,使得该方法在实际样品检测中最低检测浓度不能完全满足检测要求。

发明内容

[0004] 本发明要解决现有的直接竞争酶联免疫吸附分析方法对三唑磷的最低检出限高,不能完全满足检测要求的技术问题,而提供三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备和使用方法。

[0005] 本发明的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒由三唑磷标准品、包被有三唑磷单克隆抗体的固相载体、辣根过氧化物酶标记的三唑磷半抗原、化学发光增敏液和浓度为0.01mol/L的pH值为7.4的PBST缓冲液组成;其中三唑磷标准品由一个空白样和三唑磷浓度分别为从0.01ng/mL~2.5ng/mL中选取的6~8个值的样品组成;化学发光增敏液是按化学发光底物的浓度为0.5mmol/L~3mmol/L、对碘苯酚的浓度为0.1mmol/L~1mmol/L、过氧化氢的浓度为1mmol/L~10mmol/L,以浓度为0.1mol/L、pH值为8.5的Tris-HCl缓冲液为稀释液配制而成的溶液,其中化学发光底物为鲁米诺、异鲁米诺或7-氨基-6-巯基邻苯二甲酰肼。

[0006] 本发明的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒的制备方法,按以下步骤进行:一、以三唑磷配制三唑磷标准品:按三唑磷的浓度为从0.01ng/mL~2.5ng/mL中选取的6~

8 个值配制三唑磷溶液,分装,取各浓度的三唑磷溶液和一个空白样组成一组,得到三唑磷标准品;二、以三唑磷单克隆抗体包被固相载体:a、将三唑磷单克隆抗体加入到浓度为 0.05mol/L 的 pH 值为 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液中,并混合均匀,其中三唑磷单克隆抗体的浓度为 $4\mu\text{g/mL} \sim 20\mu\text{g/mL}$,得到包被液;b、将步骤 a 制备的包被液负载于固相载体上,接着将固相载体置于温度为 $36^{\circ}\text{C} \sim 38^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 $60\% \sim 80\%$ 的恒温恒湿培养箱中温育 2h,然后用 0.01M、pH 值为 7.4 的 PBST 缓冲液洗涤固相载体;c、将胰蛋白胍和生物防腐剂加入到 0.05mol/L 的 pH 值为 7.0 ~ 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液中,并混合均匀,其中胰蛋白胍与 Tris-HCl 缓冲液的质量体积比为 $1\text{g} : 50\text{mL} \sim 100\text{mL}$,生物防腐剂与 Tris-HCl 缓冲液的体积比为 $1 : 1000 \sim 2000$,得到封闭液;d、将步骤 c 得到的封闭液负载于步骤 b 处理后的固相载体上,得到以三唑磷单克隆抗体包被的固相载体;三、以辣根过氧化物酶标记三唑磷半抗原:e、量取辣根过氧化物酶和浓度为 0.01mol/L 的碳酸盐缓冲溶液,并将辣根过氧化物酶加入到碳酸盐缓冲溶液中,混合均匀,其中辣根过氧化物酶与碳酸盐缓冲溶液的质量体积比为 $5\text{mg} : 1\text{mL}$,得到辣根过氧化物酶溶液;f、按三唑磷半抗原的浓度为 0.25mmol/L、正三丁胺的浓度为 0.25mmol/L 和氯甲酸乙酯的浓度为 0.25mmol/L 称取三唑磷半抗原、正三丁胺、氯甲酸乙酯和二甲基甲酰胺,将三唑磷半抗原溶于二甲基甲酰胺中,然后在搅拌的条件下,加入正三丁胺和氯甲酸乙酯,加完后在室温下搅拌反应 1h,得到反应液;g、按步骤 f 得到的反应液与步骤 e 得到的辣根过氧化物酶溶液的体积比为 $1 : 20$,将反应液逐滴滴入到辣根过氧化物酶溶液中,室温搅拌反应 2h ~ 3h 后,装入透析袋,用蒸馏水和磷酸盐缓冲液透析,透析结束后,将透析袋中纯化液体取出,再加入与纯化液体体积相等的甘油和占纯化液体体积 $0.16\% \sim 0.2\%$ 的生物防腐剂,混合均匀,分装后于 $0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$ 保存,得到以辣根过氧化物酶标记三唑磷半抗原;四、配制化学发光增敏液:h、将化学发光底物加入到 0.1mol/L 的 NaOH 溶液中,得到浓度为 12.5mmol/L 的化学发光底物母液;i、将对碘苯酚加入到去离子水,得到 3mmol/L 的对碘苯酚母液;j、配制浓度为 0.1mol/L、pH 值为 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液,然后以该 Tris-HCl 缓冲液为稀释液,按化学发光底物浓度在 0.5mmol/L ~ 3mmol/L,对碘苯酚浓度在 0.1mmol/L ~ 1mmol/L,过氧化氢浓度在 1mmol/L ~ 10mmol/L,将步骤 h 制备的化学发光底物母液,步骤 i 制备的对碘苯酚母液,浓度为 30% (质量) 的过氧化氢溶液加入到 Tris-HCl 缓冲液中,混合均匀,得化学发光增敏液;五、配制并分装 PBST 缓冲液;六、将步骤一制备的三唑磷标准品、步骤二制备的三唑磷单克隆抗体包被的固相载体、步骤三制备的化学发光增敏液、步骤四制备的化学发光增敏液和步骤五制备的缓冲液装入一个盒子中,得到三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒。

[0007] 本发明的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒的使用方法按以下步骤进行:一、将三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒取出,在室温下平衡 10min ~ 15min;二、在三唑磷单克隆抗体包被的固相载体的反应孔中分别加入各浓度的三唑磷标准品和经前处理后得到的被测样品各 $50\mu\text{L}$,设置一个重复,然后每个反应孔加入以辣根过氧化物酶标记三唑磷半抗原 $50\mu\text{L}$,用微量振荡器振荡混匀,然后置于温度为 37°C ,相对湿度为 70% 的恒温恒湿培养箱中温育 1h;三、用 PBST 缓冲液洗涤 3 次;四、各反应孔中加入化学发光增敏液 $200\mu\text{L}$,用微量振荡器振荡混合均匀,在温度为 $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ 的条件下避光反应 5 分钟;五、用化学发光测定仪测定各反应孔发光强度;六、以三唑磷标准品的浓度为横坐标,各浓度所对应的发光强度抑制率为纵坐标,建立标准曲线,并根据标准曲线计算样品中的三唑磷浓

度。

[0008] 所述的前处理的方法按以下步骤进行:m、将待测样品切块后放在均质机中,均质后得到均质液;n、再按均质液与乙腈的质量体积比为1g : 1mL ~ 2mL、均质液与硫酸镁的质量比为2.5 : 0.9 ~ 1.2、均质液与氯化钠的质量比为10 : 0.9 ~ 1.1称取步骤m得到的均质液、乙腈、硫酸镁和氯化钠,先将均质液加入到乙腈中,振荡提取1min ~ 2min,然后再加入硫酸镁和氯化钠,再振摇1min ~ 2min,得到混合液;o、将步骤n得到的混合液在转速为3000rpm ~ 4000rpm的条件下离心分离5min ~ 8min,吸取上清液;p、按上清液与0.05mol/L、pH值为7.2的Tris-HCl缓冲液的体积比为1 : 1 ~ 4,甲醇与0.05mol/L、pH值为7.2的Tris-HCl缓冲液的体积比为1 : 9 ~ 11量取步骤o得到的上清液、0.05mol/L、pH值为7.2的Tris-HCl缓冲液和甲醇,先将上清液加入洁净的容器中,用氮气流吹干,再将Tris-HCl缓冲液和甲醇加入到上述的容器中,旋涡震荡1min ~ 2min,完成前处理。

[0009] 本发明采用化学发光与免疫反应相结合的化学发光免疫分析方法对食品中农药进行分析检测,因化学发光具有荧光的特异性,同时不需要激发光,从而避免了荧光分析中激发光杂散光的影响。化学发光免疫分析包含了免疫化学反应和化学发光反应两个部分,先将辣根过氧化物酶标记在三唑磷半抗原上,然后进行免疫反应,免疫反应进行的多少与辣根过氧化物酶的量成正比;再以鲁米诺、异鲁米诺或7-氨基-6-巯基邻苯二甲酰肼做为化学发光底物,在碱性环境中,在辣根过氧化物酶(HRP)酶的催化下, H_2O_2 将化学发光底物氧化发光,辣根过氧化物酶(HRP)的含量决定了化学发光底物的发光强度,从而使农药物质的量与化学发光底物的发光强度成一定的比例而达到定量的目的。本发明对于发光强度的检测是通过化学反应释放光子且经过特定波长滤光片测定的,受外源物质的干扰较少,且仪器检测时光电倍增管的存在可增强发光强度,同时化学发光增敏液的存在可促使化学反应产生的闪光变成辉光,并大大增强发光强度,最低检测限为0.06ng/mL,较酶联免疫分析方法(ELISA)对三唑磷农药的检测灵敏度可提高一个数量级以上。

[0010] 本发明的化学免疫反应为小分子竞争型反应,这与医学检验中检验对象是具有多个抗原决定簇的大分子物质不同,即农药小分子与农药半抗原竞争结合农药抗体,而标记物标记在半抗原上,因此,检测物中农药含量与标记物催化产生的化学发光强度呈反比,因此灵敏度高。本发明可以特异地定量检测蔬菜水果中三唑磷含量。它具有简便、快速、灵敏、特异、稳定等优点,并且,根据本发明的检测系统为开放式操作,简便快速,特别适合广大的质检机构推广使用,为食品安全检测提供一种非常有价值的检测手段。

附图说明

[0011] 图1为具体实施方式三十四所制备的试剂盒中的标准品浓度与抑制率的标准曲线图。

具体实施方式

[0012] 具体实施方式一:本实施方式的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒由三唑磷标准品、包被有三唑磷单克隆抗体的固相载体、辣根过氧化物酶标记的三唑磷半抗原、化学发光增敏液和浓度为0.01mol/L的pH值为7.4的PBST缓冲液组成;其中三唑磷标准品由一个空白样和三唑磷浓度分别为从0.01ng/mL ~ 2.5ng/mL中选取的6 ~ 8个值的样品组

成;化学发光增敏液是按化学发光底物的浓度为 0.5mmol/L ~ 3mmol/L、对碘苯酚的浓度为 0.1mmol/L ~ 1mmol/L、过氧化氢的浓度为 1mmol/L ~ 10mmol/L,以浓度为 0.1mol/L、pH 值为 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液为稀释液配制而成的溶液,其中化学发光底物为鲁米诺、异鲁米诺或 7-氨基-6-巯基邻苯二甲酰肼。

[0013] 本实施方式的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒在温度为 0℃ ~ 4℃ 的条件下保存。

[0014] 本实施方式采用化学发光与免疫反应相结合的化学发光免疫分析方法对食品中农药进行分析检测,因化学发光具有荧光的特异性,同时不需要激发光,从而避免了荧光分析中激发光杂散光的影响。化学发光免疫分析包含了免疫化学反应和化学发光反应两个部分,先将辣根过氧化物酶标记在三唑磷半抗原上,然后进行免疫反应,免疫反应进行的多少与辣根过氧化物酶的量成正比;再以鲁米诺、异鲁米诺或 7-氨基-6-巯基邻苯二甲酰肼做为化学发光底物,在碱性环境中,在辣根过氧化物酶 (HRP) 酶的催化下, H_2O_2 将化学发光底物氧化发光,辣根过氧化物酶 (HRP) 的含量决定了化学发光底物的发光强度,从而使农药物质的量与化学发光底物的发光强度成一定的比例而达到定量的目的。本实施方式对于发光强度的检测是通过化学反应释放光子且经过特定波长滤光片测定的,受外源物质的干扰较少,且仪器检测时光电倍增管的存在可增强发光强度,同时化学发光增敏液的存在可促使化学反应产生的闪光变成辉光,并大大增强发光强度,最低检测限为 0.06ng/mL,较酶联免疫分析方法 (ELISA) 对三唑磷农药的检测灵敏度可提高一个数量级以上。本实施方式的化学免疫反应为小分子竞争型反应,这与医学检验中检验对象是具有多个抗原决定簇的大分子物质不同,即农药小分子与农药半抗原竞争结合农药抗体,而标记物标记在半抗原上,因此,检测物中农药含量与标记物催化产生的化学发光强度呈反比,因此灵敏度高。本实施方式可以特异地定量检测蔬菜水果中三唑磷含量。它具有简便、快速、灵敏、特异、稳定等优点,并且,根据本实施方式的检测系统为开放式操作,简便快速,特别适合广大的质检机构推广使用,为食品安全检测提供一种非常有价值的检测手段。

[0015] 具体实施方式二:本实施方式与具体实施方式一不同的是所述固相载体为微孔板、塑料珠、塑料管或磁性颗粒。其它与具体实施方式一相同。

[0016] 具体实施方式三:本实施方式与具体实施方式一或二不同的是三唑磷标准品中三唑磷浓度分别为从 0.02ng/mL ~ 2.4ng/mL 中选取的 7 个值。其它与具体实施方式一或二相同。

[0017] 具体实施方式四:本实施方式与具体实施方式一至三之一不同的是:化学发光增敏液中化学发光底物的浓度为 0.8mmol/L ~ 2.7mmol/L,对碘苯酚的浓度为 0.2mmol/L ~ 0.9mmol/L,过氧化氢的浓度为 2mmol/L ~ 8mmol/L。其它与具体实施方式一至三之一相同。

[0018] 具体实施方式五:本实施方式与具体实施方式一至三之一不同的是:化学发光增敏液中化学发光底物的浓度为 1.7mmol/L,对碘苯酚的浓度为 0.6mmol/L,过氧化氢的浓度为 5mmol/L。其它与具体实施方式一至三之一相同。

[0019] 具体实施方式六:本实施方式的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒的制备方法,按以下步骤进行:一、以三唑磷配制三唑磷标准品:按三唑磷的浓度为从 0.01ng/mL ~ 2.5ng/mL 中选取的 6 ~ 8 个值配制三唑磷溶液,分装,取各浓度的三唑磷溶液和一个空白样组成一组,得到三唑磷标准品;二、以三唑磷单克隆抗体包被固相载体:a、将三唑磷单克

隆抗体加入到浓度为 0.05mol/L 的 pH 值为 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液中,并混合均匀,其中三唑磷单克隆抗体的浓度为 $4\mu\text{g/mL} \sim 20\mu\text{g/mL}$,得到包被液;b、将步骤 a 制备的包被液负载于固相载体上,接着将固相载体置于温度为 $36^{\circ}\text{C} \sim 38^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 $60\% \sim 80\%$ 的恒温恒湿培养箱中温育 2h,然后用 0.01M、pH 值为 7.4 的 PBST 缓冲液洗涤固相载体;c、将胰蛋白酶和生物防腐剂加入到 0.05mol/L 的 pH 值为 7.0 ~ 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液中,并混合均匀,其中胰蛋白酶与 Tris-HCl 缓冲液的质量体积比为 $1\text{g} : 50\text{mL} \sim 100\text{mL}$,生物防腐剂与 Tris-HCl 缓冲液的体积比为 $1 : 1000 \sim 2000$,得到封闭液;d、将步骤 c 得到的封闭液负载于步骤 b 处理后的固相载体上,得到以三唑磷单克隆抗体包被的固相载体;三、以辣根过氧化物酶标记三唑磷半抗原:e、量取辣根过氧化物酶和浓度为 0.01mol/L 的碳酸盐缓冲溶液,并将辣根过氧化物酶加入到碳酸盐缓冲溶液中,混合均匀,其中辣根过氧化物酶与碳酸盐缓冲溶液的质量体积比为 $5\text{mg} : 1\text{mL}$,得到辣根过氧化物酶溶液;f、按三唑磷半抗原的浓度为 0.25mmol/L、正三丁胺的浓度为 0.25mmol/L 和氯甲酸乙酯的浓度为 0.25mmol/L 称取三唑磷半抗原、正三丁胺、氯甲酸乙酯和二甲基甲酰胺,将三唑磷半抗原溶于二甲基甲酰胺中,然后在搅拌的条件下,加入正三丁胺和氯甲酸乙酯,加完后在室温下搅拌反应 1h,得到反应液;g、按步骤 f 得到的反应液与步骤 e 得到的辣根过氧化物酶溶液的体积比为 $1 : 20$,将反应液逐滴滴入到辣根过氧化物酶溶液中,室温搅拌反应 2h ~ 3h 后,装入透析袋,用蒸馏水和磷酸盐缓冲液透析,透析结束后,将透析袋中纯化液体取出,再加入与纯化液体体积相等的甘油和占纯化液体体积 $0.16\% \sim 0.2\%$ 的生物防腐剂,混合均匀,分装后于 $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ 保存,得到以辣根过氧化物酶标记三唑磷半抗原;四、配制化学发光增敏液:h、将化学发光底物加入到 0.1mol/L 的 NaOH 溶液中,得到浓度为 12.5mmol/L 的化学发光底物母液;i、将对碘苯酚加入到去离子水,得到 3mmol/L 的对碘苯酚母液;j、配制浓度为 0.1mol/L、pH 值为 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液,然后以该 Tris-HCl 缓冲液为稀释液,按化学发光底物浓度在 $0.5\text{mmol/L} \sim 3\text{mmol/L}$,对碘苯酚浓度在 $0.1\text{mmol/L} \sim 1\text{mmol/L}$,过氧化氢浓度在 $1\text{mmol/L} \sim 10\text{mmol/L}$,将步骤 h 制备的化学发光底物母液,步骤 i 制备的对碘苯酚母液,浓度为 30% (质量) 的过氧化氢溶液加入到 Tris-HCl 缓冲液中,混合均匀,得化学发光增敏液;五、配制并分装 PBST 缓冲液;六、将步骤一制备的三唑磷标准品、步骤二制备的三唑磷单克隆抗体包被的固相载体、步骤三制备的化学发光增敏液、步骤四制备的化学发光增敏液和步骤五制备的缓冲液装入一个盒子中,得到三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒。

[0020] 本实施方式采用化学发光与免疫反应相结合的化学发光免疫分析方法对食品中农药进行分析检测,因化学发光具有荧光的特异性,同时不需要激发光,从而避免了荧光分析中激发光杂散光的影响。化学发光免疫分析包含了免疫化学反应和化学发光反应两个部分,先将辣根过氧化物酶标记在三唑磷半抗原上,然后进行免疫反应,免疫反应进行的多少与辣根过氧化物酶的量成正比;再以鲁米诺、异鲁米诺或 7-氨基-6-巯基邻苯二甲酰肼做为化学发光底物,在碱性环境中,在辣根过氧化物酶的催化下, H_2O_2 将化学发光底物氧化发光,辣根过氧化物酶的含量决定了化学发光底物的发光强度,从而使农药物质的量与化学发光底物的发光强度成一定的比例而达到定量的目的。本实施方式对于发光强度的检测是通过化学反应释放光子且经过特定波长滤光片测定的,受外源物质的干扰较少,且仪器检测时光电倍增管的存在可增强发光强度,同时化学发光增敏液的存在可促使化学反应产生的闪光变成辉光,并大大增强发光强度,最低检测限为 0.06ng/mL ,较酶联免疫分析方法对

三唑磷农药的检测灵敏度可提高一个数量级以上。本实施方式的化学免疫反应为小分子竞争型反应,这与医学检验中检验对象是具有多个抗原决定簇的大分子物质不同,即农药小分子与农药半抗原竞争结合农药抗体,而标记物标记在半抗原上,因此,检测物中农药含量与标记物催化产生的化学发光强度呈反比,因此灵敏度高。本实施方式可以特异地定量检测蔬菜水果中三唑磷含量。它具有简便、快速、灵敏、特异、稳定等优点,并且,根据本实施方式的检测系统为开放式操作,简便快速,特别适合广大的质检机构推广使用,为食品安全检测提供一种非常有价值的检测手段。

[0021] 具体实施方式七:本实施方式与具体实施方式六不同的是:步骤一中三唑磷的浓度为 0.04ng/mL、0.08ng/mL、0.15ng/mL、0.3ng/mL、0.6ng/mL、1.25ng/mL 和 2.50ng/mL 共 7 个。其它与具体实施方式六相同。

[0022] 具体实施方式八:本实施方式与具体实施方式六不同的是:步骤一中三唑磷的浓度为 0.035ng/mL、0.07ng/mL、0.20ng/mL、0.35ng/mL、1.0ng/mL 和 2.40ng/mL 共 6 个。其它与具体实施方式六相同。

[0023] 具体实施方式九:本实施方式与具体实施方式六不同的是:步骤一中三唑磷的浓度为 0.03ng/mL、0.06ng/mL、0.18ng/mL、0.30ng/mL、1.5ng/mL 和 2.3ng/mL 共 6 个。其它与具体实施方式六相同。

[0024] 具体实施方式十:本实施方式与具体实施方式六不同的是:步骤一中三唑磷的浓度为 0.05ng/mL、0.10ng/mL、0.15ng/mL、0.25ng/mL、0.4ng/mL、1.6ng/mL 和 2.45ng/mL 共 7 个。其它与具体实施方式六相同。

[0025] 具体实施方式十一:本实施方式与具体实施方式六至十之一不同的是:步骤二的 a 中三唑磷单克隆抗体的浓度为 5 μ g/mL ~ 18 μ g/mL。其它与具体实施方式六至十之一相同。

[0026] 具体实施方式十二:本实施方式与具体实施方式六至十之一不同的是:步骤二的 a 中三唑磷单克隆抗体的浓度为 10 μ g/mL。其它与具体实施方式六至十之一相同。

[0027] 具体实施方式十三:本实施方式与具体实施方式六至十二之一不同的是:步骤二的 b 中恒温恒湿培养箱的温度为 36.5 $^{\circ}$ C ~ 37.5 $^{\circ}$ C、相对湿度为 62% ~ 78%。其它与具体实施方式六至十二之一相同。

[0028] 具体实施方式十四:本实施方式与具体实施方式六至十二之一不同的是:步骤二的 b 中恒温恒湿培养箱的温度为 37.0 $^{\circ}$ C、相对湿度为 70%。其它与具体实施方式六至十二之一相同。

[0029] 具体实施方式十五:本实施方式与具体实施方式六至十四之一不同的是:步骤二的 c 中生物防腐剂为叠氮钠。其它与具体实施方式六至十四之一相同。

[0030] 具体实施方式十六:本实施方式与具体实施方式六至十五之一不同的是:步骤二的 c 中胰蛋白胨与 Tris-HCl 缓冲液的质量体积比为 1g : 55mL ~ 95mL,生物防腐剂与 Tris-HCl 缓冲液的体积比为 1 : 1100 ~ 1800。其它与具体实施方式六至十五之一相同。

[0031] 具体实施方式十七:本实施方式与具体实施方式六至十五之一不同的是:步骤二的 c 中胰蛋白胨与 Tris-HCl 缓冲液的质量体积比为 1g : 75mL,生物防腐剂与 Tris-HCl 缓冲液的体积比为 1 : 1500。其它与具体实施方式六至十五之一相同。

[0032] 具体实施方式十八:本实施方式与具体实施方式六至十七之一不同的是:步骤三

的 g 中将反应液滴入到辣根过氧化物酶溶液后,室温下搅拌 2.2h ~ 2.8h。其它与具体实施方式六至十七之一相同。

[0033] 具体实施方式十九:本实施方式与具体实施方式六至十七之一不同的是:步骤三的 g 中将反应液滴入到辣根过氧化物酶溶液后,室温下搅拌 2.5h。其它与具体实施方式六至十七之一相同。

[0034] 具体实施方式二十:本实施方式与具体实施方式六至十九之一不同的是:步骤三的 g 中所述的透析是将透析袋浸入蒸馏水中保持 4h ~ 8h,用蒸馏水透析 3 次,然后用 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 透析 3 天,每天更换透析液 3 ~ 4 次。其它与具体实施方式六至十九之一相同。

[0035] 具体实施方式二十一:本实施方式与具体实施方式六至十九之一不同的是:步骤三的 g 中将透析袋浸入蒸馏水中保持 6h。其它与具体实施方式六至十九之一相同。

[0036] 具体实施方式二十二:本实施方式与具体实施方式六至二十一之一不同的是:步骤三的 g 中生物防腐剂的加入量为占纯化液体体积 0.17% ~ 0.19%。其它与具体实施方式六至二十一之一相同。

[0037] 具体实施方式二十三:本实施方式与具体实施方式六至二十一之一不同的是:步骤三的 g 中生物防腐剂的加入量为占纯化液体体积 0.18%。其它与具体实施方式六至二十一之一相同。

[0038] 具体实施方式二十四:本实施方式与具体实施方式六至二十三之一不同的是:步骤三的 g 中分装后的保存温度为 0.5 ~ 3.5℃。其它与具体实施方式六至二十三之一相同。

[0039] 具体实施方式二十五:本实施方式与具体实施方式六至二十三之一不同的是:步骤三的 g 中分装后的保存温度为 2.5℃。其它与具体实施方式六至二十三之一相同。

[0040] 具体实施方式二十六:本实施方式与具体实施方式六至二十五之一不同的是:步骤四中的 j 中化学发光底物的浓度为 0.8mmol/L ~ 2.8mmol/L,对碘苯酚浓度在 0.2mmol/L ~ 0.8mmol/L,过氧化氢浓度在 2mmol/L ~ 8mmol/L。其它与具体实施方式六至二十五之一相同。

[0041] 具体实施方式二十七:本实施方式与具体实施方式六至二十五之一不同的是:步骤四中的 j 中化学发光底物的浓度为 1.8mmol/L,对碘苯酚浓度在 0.5mmol/L,过氧化氢浓度在 5mmol/L。其它与具体实施方式六至二十五之一相同。

[0042] 具体实施方式二十八:本实施方式与具体实施方式六至二十七之一不同的是:步骤五中 PBST 缓冲液的配制方法为:称取 0.27gKH₂PO₄、1.14g 无水 Na₂HPO₄、8.0gNaCl 和 0.2gKCl,用双蒸水定容至 1L,得溶液,再加入占溶液总质量 0.05%的吐温 20,混合均匀即得到 PBST 缓冲液。其它与具体实施方式六至二十七之一相同。

[0043] 具体实施方式二十九:本实施方式的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒的使用方法按以下步骤进行:一、将三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒取出,在室温下平衡 10min ~ 15min;二、在三唑磷单克隆抗体包被的固相载体的反应孔中分别加入各浓度的三唑磷标准品和经前处理后得到的被测样品各 50 μL,设置一个重复,然后每个反应孔加入以辣根过氧化物酶标记三唑磷半抗原 50 μL,用微量振荡器振荡混匀,然后置于温度为 37℃,相对湿度为 70%的恒温恒湿培养箱中温育 1h;三、用 PBST 缓冲液洗涤 3 次;四、各反应孔中加入化学发光增敏液 200 μL,用微量振荡器振荡混合均匀,在温度为 20℃ ~ 25℃的条件下

避光反应 5 分钟；五、用化学发光测定仪测定各反应孔发光强度；六、以三唑磷标准品的浓度为横坐标，各浓度所对应的发光强度抑制率为纵坐标，建立标准曲线，并根据标准曲线计算样品中的三唑磷浓度。

[0044] 按本实施方式的试剂盒的使用方法，三唑磷含量最低检测限为 0.06ng/mL，较酶联免疫分析方法对三唑磷农药的检测灵敏度可提高一个数量级以上。本实施方式的化学免疫反应为小分子竞争型反应，这与医学检验中检验对象是具有多个抗原决定簇的大分子物质不同，即农药小分子与农药半抗原竞争结合农药抗体，而标记物标记在半抗原上，因此，检测物中农药含量与标记物催化产生的化学发光强度呈反比，因此灵敏度高。本实施方式可以特异地定量检测蔬菜水果中三唑磷含量。它具有简便、快速、灵敏、特异、稳定等优点，并且，根据本实施方式的检测系统为开放式操作，简便快速。

[0045] 具体实施方式三十：本实施方式与具体实施方式二十九不同的是：步骤一中三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒取出后，在室温下平衡 11min ~ 14min。其它与具体实施方式二十九相同。

[0046] 具体实施方式三十一：本实施方式与具体实施方式二十九不同的是：步骤一中三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒取出后，在室温下平衡 13min。其它与具体实施方式二十九相同。

[0047] 具体实施方式三十二：本实施方式与具体实施方式二十九至三十一之一不同的是：步骤二中被测样品的前处理的方法按以下步骤进行：m、将待测样品切块后放在均质机中，均质后得到均质液；n、再按均质液与乙腈的质量体积比为 1g : 1mL ~ 2mL、均质液与硫酸镁的质量比为 2.5 : 0.9 ~ 1.2、均质液与氯化钠的质量比为 10 : 0.9 ~ 1.1 称取步骤 m 得到的均质液、乙腈、硫酸镁和氯化钠，先将均质液加入到乙腈中，振荡提取 1min ~ 2min，然后再加入硫酸镁和氯化钠，再振摇 1min ~ 2min，得到混合液；o、将步骤 n 得到的混合液在转速为 3000rpm ~ 4000rpm 的条件下离心分离 5min ~ 8min，吸取上清液；p、按上清液与 0.05mol/L、pH 值为 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液的体积比为 1 : 1 ~ 4，甲醇与 0.05mol/L、pH 值为 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液的体积比为 1 : 9 ~ 11 量取步骤 o 得到的上清液、0.05mol/L、pH 值为 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液和甲醇，先将上清液加入洁净的容器中，用氮气流吹干，再将 Tris-HCl 缓冲液和甲醇加入到上述的容器中，旋涡震荡 1min ~ 2min，完成前处理。其它与具体实施方式二十九至三十一之一相同。

[0048] 具体实施方式三十三：本实施方式与具体实施方式二十九至三十一之一不同的是：步骤二中被测样品的前处理的方法按以下步骤进行：m、将待测样品切块后放在均质机中，均质后得到均质液；n、再按均质液与乙腈的质量体积比为 1g : 1.5mL、均质液与硫酸镁的质量比为 2.5 : 1.0、均质液与氯化钠的质量比为 10 : 1 称取步骤 m 得到的均质液、乙腈、硫酸镁和氯化钠，先将均质液加入到乙腈中，振荡提取 1.5min，然后再加入硫酸镁和氯化钠，再振摇 1.5min，得到混合液；o、将步骤 n 得到的混合液在转速为 3500rpm 的条件下离心分离 6min，吸取上清液；p、按上清液与 0.05mol/L、pH 值为 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液的体积比为 1 : 2，甲醇与 0.05mol/L、pH 值为 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液的体积比为 1 : 10 量取步骤 o 得到的上清液、0.05mol/L、pH 值为 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液和甲醇，先将上清液加入洁净的容器中，用氮气流吹干，再将 Tris-HCl 缓冲液和甲醇加入到上述的容器中，旋涡震荡 1.5min，完成前处理。其它与具体实施方式二十九至三十一之一相同。

[0049] 具体实施方式三十四：本实施方式的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒由三唑磷标准品、包被有三唑磷单克隆抗体的固相载体、辣根过氧化物酶标记的三唑磷半抗原、化学发光增敏液和 0.01M, pH 值为 7.4 的 PBST 缓冲液组成；其中所述的三唑磷标准品中有一个空白样和三唑磷浓度分别为 0ng/mL、0.039ng/mL、0.078ng/mL、0.156ng/mL、0.313ng/mL、0.625ng/mL、1.25ng/mL 和 2.50ng/mL 的三唑磷溶液；所述化学发光增敏液按鲁米诺的浓度为 1.25mmol/L、对碘苯酚的浓度为 0.15mmol/L 和过氧化氢的浓度为 2.5mmol/L、以浓度为 0.1mol/L、pH 值为 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液为稀释液配制而成的溶液。

[0050] 本实施方式中所述固相载体为微孔板。

[0051] 本实施方式的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒的制备方法，按以下步骤进行：一、以三唑磷配制三唑磷标准品：按三唑磷的浓度分别为 0.039ng/mL、0.078ng/mL、0.156ng/mL、0.313ng/mL、0.625ng/mL、1.25ng/mL 和 2.50ng/mL 配制三唑磷溶液，分装，取各浓度的三唑磷溶液和一个空白样组成一组，得到三唑磷标准品；二、以三唑磷单克隆抗体包被固相载体：a、将三唑磷单克隆抗体加入到 0.05mol/L pH 值为 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液中，并混合均匀，其中三唑磷单克隆抗体的浓度为 10 μg/mL，得到包被液；b、将步骤 a 制备的包被液负载于固相载体上，置于温度为 37℃、相对湿度为 70% 的恒温恒湿培养箱中温育 2h，然后用 0.01M pH 值为 7.4 的 PBST 缓冲液洗涤固相载体；c、将胰蛋白胍和叠氮钠加入到 0.05mol/L pH 值为 7.2~7.5 的 Tris-HCl 缓冲液中，并混合均匀，其中胰蛋白胍与 Tris-HCl 缓冲液的质量体积比为 1g : 100mL，叠氮钠与 Tris-HCl 缓冲液的体积比为 1 : 1000，得到封闭液；d、将步骤 c 得到的封闭液负载于步骤 b 处理后的固相载体上，得到以三唑磷单克隆抗体包被的固相载体；三、以辣根过氧化物酶标记三唑磷半抗原：e、量取浓度为 0.01mol/L 的碳酸盐缓冲溶液和辣根过氧化物酶 (HRP)，并将辣根过氧化物酶 (HRP) 加入到碳酸盐缓冲溶液 (CBS) 中，混合均匀，其中辣根过氧化物酶与碳酸盐缓冲溶液的质量体积比为 5mg : 1mL，得到辣根过氧化物酶溶液；f、按三唑磷半抗原的浓度为 0.25mmol/L、正三丁胺的浓度为 0.25mmol/L 和氯甲酸乙酯的浓度为 0.25mmol/L 称取三唑磷半抗原、正三丁胺、氯甲酸乙酯和二甲基甲酰胺，将三唑磷半抗原溶于二甲基甲酰胺中，然后在搅拌的条件下，加入正三丁胺和氯甲酸乙酯，加完后在室温下搅拌反应 1h，得到反应液；g、按步骤 f 得到的反应液与步骤 e 得到的辣根过氧化物酶溶液的体积比为 1 : 20，将反应液逐滴滴入到辣根过氧化物酶溶液中，室温搅拌反应 2h 后，装入透析袋，将透析袋浸入蒸馏水中保持 4h，用蒸馏水透析 3 次，然后用 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 透析 3 天，每天换透析液 4 次，将透析袋中纯化液体取出，再加入与纯化液体体积相等的甘油和占纯化液体体积 0.2% 的叠氮钠，混合均匀，分装后于温度为 4℃ 的条件下保存，得到以辣根过氧化物酶标记三唑磷半抗原；四、配制化学发光增敏液：h、将鲁米诺加入到 0.1mol/L 的 NaOH 溶液中，得到 12.5mmol/L 的鲁米诺母液；i、将对碘苯酚加入到去离子水，得到 3mmol/L 的对碘苯酚母液；j、配制浓度为 0.1mol/L、pH 值为 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液，然后以该 Tris-HCl 缓冲液为稀释剂，按鲁米诺的浓度为 1.25mmol/L、对碘苯酚的浓度为 0.15mmol/L 和过氧化氢的浓度为 2.5mmol/L 移取步骤 h 制备的化学发光底物母液、步骤 i 制备的对碘苯酚母液和浓度为 30% (质量) 的过氧化氢溶液，混合均匀，得到化学发光增敏液；五、称取 0.27gKH₂PO₄、1.14g 无水 Na₂HPO₄、8.0gNaCl 和 0.2gKCl，用双蒸水定容至 1L，得溶液，再加入占溶液总质量 0.05% 的吐温 20，混合均匀，分装，得到 PBST 缓冲液；六、将步骤一制备的三唑磷标准品、步骤二制备的三唑

磷单克隆抗体包被的固相载体、步骤三制备的化学发光增敏液、步骤四制备的化学发光增敏液和步骤五制备的缓冲液装入一个盒子中,得到三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒。

[0052] 应用本实施方式的制备的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒对生菜、胡萝卜和苹果样品中三唑磷含量进行检测的使用方法按以下步骤进行:一、将三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒取出,在室温下平衡 10min;二、在三唑磷单克隆抗体包被的固相载体的反应孔中分别加入各浓度的三唑磷标准品和经前处理后得到的被测样品各 50 μ L,设置一个重复,然后每个反应孔加入以辣根过氧化物酶标记三唑磷半抗原 50 μ L,用微量振荡器振荡混匀,然后置于温度为 37 $^{\circ}$ C,相对湿度为 70%的恒温恒湿培养箱中温育 1h;三、用 PBST 缓冲液洗涤三次;四、各反应孔中加入化学发光增敏液 200 μ L,用微量振荡器振荡混合均匀,在温度为 20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C的条件下避光反应 5 分钟;五、用化学发光测定仪测定各反应孔发光强度;六、以三唑磷标准品的浓度为横坐标,各浓度所对应的发光强度抑制率为纵坐标,建立标准曲线,并根据标准曲线计算样品中的三唑磷浓度。

[0053] 所述的前处理的方法按以下步骤进行:m、将待测生菜、胡萝卜和苹果样品切块后放在均质机中,均质后得到均质液;n、再按均质液与乙腈的质量体积比为 1g:1mL、均质液与硫酸镁的质量比为 2.5:1、均质液与氯化钠的质量比为 10:1 称取步骤 m 得到的均质液、乙腈、硫酸镁和氯化钠,先将均质液加入到乙腈中,振荡提取 1min,然后再加入硫酸镁和氯化钠,再振摇 1min,得到混合液;o、将步骤 n 得到的混合液在转速为 3000rpm 的条件下离心分离 5min,吸取上清液;p、按上清液与 0.05mol/L、pH 值为 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液的体积比为 1:1,甲醇与 0.05mol/L、pH 值为 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液的体积比为 1:10 量取步骤 o 得到的上清液、0.05mol/L、pH 值为 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液和甲醇,先将上清液加入洁净的容器中,用氮气流吹干,再将 Tris-HCl 缓冲液和甲醇加入到上述的容器中,旋涡震荡 1min,完成前处理。

[0054] 本实施方式三唑磷化学发光免疫分析竞争反应标准曲线如图 1 所示,从图 1 可以看出,发光强度抑制率(y)与三唑磷浓度(x)的关系近似为 $y = 15.957\ln(x) + 55.33$,拟合曲线的 $R^2 = 0.9896$ 。

[0055] 在生菜、胡萝卜和苹果样品中分别添加浓度为 10ng/mL 和 50ng/mL 的三唑磷,然后用本实施方式的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒测试三唑磷添加回收率试验结果如表 2 所示。

[0056] 表 2 样品中三唑磷的添加回收率

[0057]

样品	本底值 ±S.D. (ng/mg,n=8)	添加浓度 (ng/mg)	^a 平均检测 值±S.D. (ng/mg)	平均添加回 收率 (%,n=8)	C.V. (%)
生菜	3.639±0.878	10.0	14.32±2.566	106.8	17.92
		50.0	56.76±8.733	106.2	15.38
胡萝卜	3.464±0.733	10.0	11.04±2.126	75.71	19.26
		50.0	59.74±6.586	112.5	11.02
苹果	6.375±1.227	10.0	18.65±3.372	122.8	18.08
		50.0	42.17±7.351	71.59	17.43

[0058] ^a 平均检测值包括样品本底值。

[0059] 按照本领域中常规的检定规程对本实施方式中制备的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒进行鉴定,结果见表 3。

[0060] 表 3 本实施方式的三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒的方法学检定结果

[0061]

检验项目	检验标准	检验结果
准确性	平均回收率在 70% -120%	93.9%
特异性	与其类似物的交叉反应率≤ 0.1%	≤ 0.1%
精密性 C.V.(%)	≤ 20% (n = 10)	17.6%
最低检测限	/	0.06ng/mL
稳定性	各试剂组分置 37℃ 至少 6 天	符合以上指标

[0062] 以上结果表明“三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒”的准确性、特异性、精密性、灵敏度和稳定性是完全符合实际检测要求的。

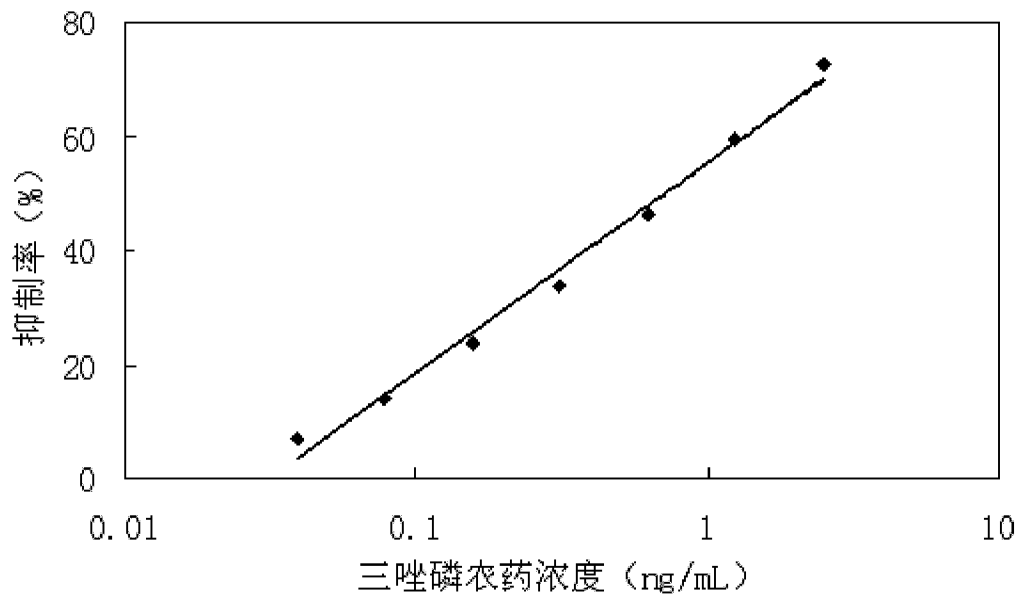


图 1

专利名称(译)	三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备和使用方法		
公开(公告)号	CN102175865A	公开(公告)日	2011-09-07
申请号	CN201010611129.8	申请日	2010-12-29
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
[标]发明人	金茂俊 王静 邵华 金芬		
发明人	金茂俊 王静 邵华 金芬		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/545 G01N33/546 G01N33/535		
其他公开文献	CN102175865B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备和使用方法，它涉及三唑磷分析测定试剂盒及其制备和使用方法。本发明解决了现有的直接竞争酶联免疫吸附分析方法的最低检出限高的技术问题。三唑磷化学发光免疫分析测定试剂盒由三唑磷标准品、包被三唑磷单克隆抗体的载体、辣根过氧化物酶标记的三唑磷半抗原、化学发光增敏液和PBST缓冲液组成；制备：将配制的三唑磷标准品、三唑磷单克隆抗体包被的载体、化学发光增敏液和缓冲液装入盒子，得到试剂盒。使用：将三唑磷标准品和样品分别加入载体反应孔中，洗涤后加化学发光增敏液，测定发光强度，绘标准曲线，查出样品中的三唑磷浓度。本发明三唑磷最低检测限0.06ng/mL，可用于食品领域。

样品	本底值 ±S.D. (ng/mg,n=8)	添加浓度 (ng/mg)	^a 平均检测 值±S.D. (ng/mg)	平均添加回 收率 (%,n=8)	C.V. (%)
生菜	3.639±0.878	10.0	14.32±2.566	106.8	17.92
		50.0	56.76±8.733	106.2	15.38
胡萝卜	3.464±0.733	10.0	11.04±2.126	75.71	19.26
		50.0	59.74±6.586	112.5	11.02
苹果	6.375±1.227	10.0	18.65±3.372	122.8	18.08
		50.0	42.17±7.351	71.59	17.43