

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

专利号 ZL 200410065107.0

[45] 授权公告日 2007 年 1 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 1294417C

[22] 申请日 2004.10.20

[21] 申请号 200410065107.0

[73] 专利权人 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 尤海琴

[56] 参考文献

CN 1385704 A 2002.12.18 G01N 33/53

CN 1523356 A 2004.8.25 G01N 33/53

审查员 黄 磊

[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 6 页

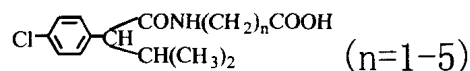
[54] 发明名称


氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒

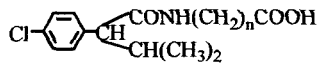
[57] 摘要

本发明涉及氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒。合成半抗原见右式(n=1-5)并与不同蛋白质共价偶联分别制备人工抗原和包被原,以人工抗原免疫动物获得对氰戊菊酯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分别得到酶标抗体和酶标半抗原。用包被原或抗体包被微孔板,加入待测样品(或氰戊菊酯标样)与酶标半抗原或酶标抗体的混合液,氰戊菊酯、酶标抗体或酶标半抗原与包被在微孔板上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,酶促显色反应的强度与样品(或标样)中氰戊菊酯的含量成反比,据此建立氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法并根据该方法制备试剂盒,用于果蔬、茶叶、环境等样本中残留氰戊

菊酯的快速检测。



1. 一种用于氰戊菊酯快速检测的直接竞争酶联免疫吸附分析方法，其特征是以  (n=1-5) 为半抗原，与牛血清白蛋白、卵清蛋白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氰戊菊酯具特异性亲合力的抗体，以辣根过氧化物酶标记所述抗体和半抗原得到酶标抗体和酶标半抗原，用包被原或抗体包被聚苯乙烯微孔板，加入待测样品或氰戊菊酯标样与酶标抗体或酶标半抗原的混合液，氰戊菊酯、酶标抗体或酶标半抗原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，与样品或标样中氰戊菊酯的含量成反比。

2. 根据权利要求1所述氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法，其特征是所述半抗原是以 2-(4-氯苯基)-3-甲基丁酰氯与氨基酸缩合而成，其分子结构式为  (n=1-5)。

3. 根据权利要求1所述氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法，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、卵清蛋白共价偶联而成。

4. 根据权利要求1所述氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法，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、羊或鼠制备的对氰戊菊酯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氰戊菊酯具有特异性亲合力的单克隆抗体。

5. 根据权利要求1所述氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法，其特征是所述酶标抗体是采用改良过碘酸盐法将辣根过氧化物酶与所述抗体共价偶联而成，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。

6、根据权利要求1所述氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法，其特征是以所述包被原或所述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所述氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法，其特征是所述酶的底物为过氧化脲或过氧化氢。

8、根据权利要求1所述氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法，其特征是所述显色剂为3',3',5',5'-四甲基联苯胺或邻苯二胺。

9、根据权利要求1所述氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法制得的试剂盒，其特征是设有盒体及置于盒体内的可拆卸式用包被原或抗体包被聚苯乙烯微孔板、包被原或对氰戊菊酯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、氰戊菊酯标样、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。

氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒

技术领域

本发明涉及氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒，主要应用于果蔬、粮食、茶叶、环境中残留氰戊菊酯的快速检测。

背景技术

氰戊菊酯是一种应用广泛的拟除虫菊酯类杀虫剂，对危害棉花、果树、蔬菜、茶、大豆、小麦等农作物的鳞翅目、同翅目、直翅目、半翅目害虫（如棉铃虫、蚜虫、菜青虫、茶毛虫、大豆食心虫等）的幼虫有良好的防治效果，也可防治地老虎等夜蛾科害虫。氰戊菊酯对大鼠的毒性中等，对鱼和其他水生生物毒性大。人误服氰戊菊酯可能引起呕吐、神经过敏、悸惧、流涎等症状，严重时发生震颤和全身痉挛。目前，无论是单位面积用量还是总用量，氰戊菊酯是我国拟除虫菊酯类农药中使用量最大的品种，农产品中氰戊菊酯残留超标直接影响食品安全，对环境构成一定威胁。我国强制性国家标准规定，氰戊菊酯最大残留限量叶菜类为 0.5 mg/kg，谷类（原粮）、果类菜、水果为 0.2 mg/kg，根块类菜为 0.05 mg/kg。欧盟近年来将氰戊菊酯定为农产品中不得检出的农药品种，严重影响我国茶叶等农产品的出口。


目前已报道的氰戊菊酯残留检测方法主要有高效液相色谱法和气相色谱法。采用这些方法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，对样品前处理的要求高、过程复杂、速度慢、选择性差，检测灵敏度有限，难以适应大量样本和现场快速检测的要求。酶联免疫吸附分析具有特异性强、灵敏度高、方便快捷、廉价高效、不需要贵重仪器、可

多个样品同时测定等优势。但国外已报道的氰戊菊酯免疫分析方法与其他一些结构类似物有明显的交叉反应。因此，建立对氰戊菊酯特异性免疫分析方法，对于加强农副产品和环境残留氰戊菊酯的监测、保障食品安全和人类健康、保护环境等具有重要意义。


发明内容

本发明的目的是提供一种特异性强、灵敏度高、适合农产品和环境残留氰戊菊酯快速检测的直接竞争酶联免疫吸附分析方法。

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、适合农产品和环境残留氰戊菊酯快速检测的酶联免疫吸附检测试剂盒。

本发明的技术方案一是：氰戊菊酯快速检测的直接竞争酶联免疫吸附分析方法，其特征是以  (n=1-5) 为半抗原，与牛血清白蛋白、卵清蛋白共价偶联合成人工抗原和包被原，以人工抗原免疫动物制备对氰戊菊酯具特异性亲合力的抗体，以辣根过氧化物酶标记所述抗体和半抗原得到酶标抗体和酶标半抗原，用包被原或抗体包被聚苯乙烯微孔板，加入待测样品（或氰戊菊酯标样）与酶标抗体或酶标半抗原的混合液，氰戊菊酯、酶标抗体或酶标半抗原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）中氰戊菊酯的含量成反比，从而建立氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法并制备氰戊菊酯免疫检测试剂盒。

所述半抗原是以 2-(4-氯苯基)-3-甲基丁酰氯与氨

基酸缩合而成，其分子结构式为  (n=1-5)。

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、卵清蛋白共价偶联而成。

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、羊或鼠制备的对氰戊菊酯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氰戊菊酯具有特异性亲合力的单克隆抗体。

所述酶标抗体是采用改良过碘酸盐法将辣根过氧化物酶与所述抗体共价偶联而成，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。

所述包被原或所述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。

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'-四甲基联苯胺或邻苯二胺。

本发明的技术方案二是：一种用于氰戊菊酯快速检测的直接竞争酶联免疫吸附分析方法的试剂盒，其特征是设有盒体及置于盒体内的可拆卸式用包被原或抗体包被聚苯乙烯微孔板、包被原或对氰戊菊酯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、氰戊菊酯标样、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。试剂盒对氰戊菊酯检测的线性浓度范围是 $10^{-2} \sim 10^1$ $\mu\text{g/mL}$ ，检测限 5ng/mL。

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方法。分子量小于 5000 道尔顿的化合物一般不具备免疫原性，将氰戊菊酯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氰戊菊酯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所述抗体和半抗原。用包被原或对氰戊菊酯具

特异性亲合力的抗体包被聚苯乙烯微孔板，加入待测样品（或氰戊菊酯标样）与酶标抗体或酶标半抗原的混合液，氰戊菊酯、酶标抗体或酶标半抗原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）中氰戊菊酯的含量成反比，据此建立氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法。根据该方法，在盒内设置相关试剂与材料，制备免疫检测试剂盒，用于农产品和环境残留氰戊菊酯的快速检测，具有特异性强、灵敏度高、廉价高效等特点，有很高的实用价值和广阔的推广应用前景。

具体实施方式

一、氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法实施例

以 2-(4-氯苯基)-3-甲基丁酰氯与氨基酸缩合，经分离纯化得



法与牛血清白蛋白、卵清蛋白共价偶联成人工抗原和包被原。用所述人工抗原与适量弗氏佐剂混合乳化后免疫兔、羊、鼠制备对氰戊菊酯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氰戊菊酯具有特异性亲合力的单克隆抗体。采用改良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，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。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（或氰戊菊酯标样）与酶标半抗原或酶标抗体的混合液，氰戊菊酯、酶标抗体或酶标半抗原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，加入酶的底物过氧化脲（或过氧化氢）与显色剂的混合液，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的量或结合在抗体上的酶标半抗原的量成正比，与样品或标样中氰戊菊酯的含量成反比，据此建立氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法，对待测样品中的氰戊菊酯进行定性定量快速检测。

二、氰戊菊酯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 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. 氰戊菊酯标样溶液的配制 准确称取氰戊菊酯标样 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氰戊菊酯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% 的甘油中，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氰戊菊酯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 $^{\circ}$ C 以下保存。

6. 磷酸盐缓冲液的配制 0.2mol/L NaH_2PO_4 510 mL 加 0.2mol/L Na_2HPO_4 490 mL、 NaN_3 2g、吐温-20 2mL 溶解混匀，4 $^{\circ}$ C 保存。

7. 封闭液的配制 5.0g 明胶、0.5g NaN_3 溶于 0.01mol/L pH6.8 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 3', 3', 5', 5' -四甲基联苯胺 0.44g 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 100mL 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 (或对氰戊菊酯具特异性亲合力的抗体) 适量/瓶、氰戊菊酯标样 0.1mL/瓶、酶标抗体 0.1mL/瓶、酶标半抗原 0.1mL/瓶、碳酸盐缓冲液 12mL/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, 包被原或对氰戊菊酯具特异性亲合力的抗体、氰戊菊酯标样溶液、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、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 (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)。试剂盒检验合格后封装, 4℃ 保存。

专利名称(译)	氟戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒		
公开(公告)号	CN1294417C	公开(公告)日	2007-01-10
申请号	CN200410065107.0	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		
当前申请(专利权)人(译)	扬州大学		
[标]发明人	刘曙照 尤海琴		
发明人	刘曙照 尤海琴		
IPC分类号	G01N33/547 G01N33/535 G01N33/531		
代理人(译)	胡定华		
其他公开文献	CN1624480A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及氟戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒。合成半抗原见右式(n = 1-5)并与不同蛋白质共价偶联分别制备人工抗原和包被原，以人工抗原免疫动物获得对氟戊菊酯具特异性亲和力的抗体，以辣根过氧化物酶标记抗体和半抗原分别得到酶标抗体和酶标半抗原。用包被原或抗体包被微孔板，加入待测样品(或氟戊菊酯标样)与酶标半抗原或酶标抗体的混合液，氟戊菊酯、酶标抗体或酶标半抗原与包被在微孔板上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，酶促显色反应的强度与样品(或标样)中氟戊菊酯的含量成反比，据此建立氟戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析方法并根据该方法制备试剂盒，用于果蔬、茶叶、环境等样本中残留氟戊菊酯的快速检测。

