

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810025907.8

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 8 月 13 日

[11] 公开号 CN 101241135A

[22] 申请日 2008.1.18

[21] 申请号 200810025907.8

[71] 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市广东省广州市天河区五山

[72] 发明人 孙远明 杨金易 雷红涛 吴青
王弘 肖治理 沈玉栋

[74] 专利代理机构 广州粤高专利代理有限公司
代理人 林丽明 任重

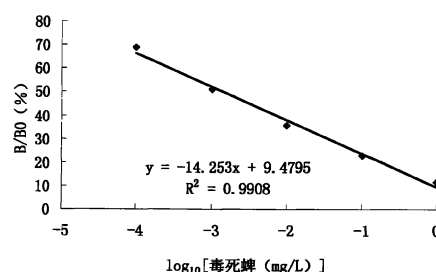
权利要求书 3 页 说明书 20 页 附图 2 页

[54] 发明名称

检测毒死蜱残留的酶联免疫试剂盒及其使用方法

[57] 摘要

本发明公开了一种检测农药毒死蜱残留的酶联免疫试剂盒，包括：包被有抗抗体的酶标板，毒死蜱抗体工作液、酶标记毒死蜱抗原工作液、毒死蜱标准溶液、底物液、底物缓冲液、反应终止液和浓缩洗涤液。本发明还公开了使用所述试剂盒检测毒死蜱的方法，包括样品的前处理，利用试剂盒进行检测，结果的处理与分析。本发明采用毒死蜱抗体经与抗体反应被吸附于固相载体上的间接竞争酶联免疫吸附分析技术，试剂盒的灵敏度与稳定性大大增强，非常适合环境与农产品中痕量毒死蜱残留的检测，具有重要的现实意义。



1、一种检测毒死蜱残留的酶联免疫试剂盒，其特征在于包含下列成分：

- (1) 包被抗抗体的酶标板；
- (2) 毒死蜱抗体工作液；
- (3) 酶标记毒死蜱抗原工作液；
- (4) 毒死蜱标准溶液；
- (5) 底物液；
- (6) 底物缓冲液；
- (7) 终止液；
- (8) 浓缩洗涤液。

2、根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于所述酶标板采用 96 孔或 40 孔酶标板，包被有能与毒死蜱抗体特异结合的抗体，并封闭微孔表面未吸附抗抗体的位点；所述抗抗体是以羊为免疫动物，以鼠源性抗体或兔源性抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫得到的羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体。

3、根据权利要求 1 所述酶联免疫分析试剂盒，其特征在于所述毒死蜱抗体是采用毒死蜱抗原免疫小鼠得到的鼠单克隆抗体、免疫白兔得到的兔多克隆抗体或免疫小鼠制备得到的基因工程抗体的任意一种。

4、根据权利要求 1 所述酶联免疫分析试剂盒，其特征在于所述酶标记毒死蜱抗原是采用混合酸酐法将标记酶与毒死蜱抗原进行偶

联得到；所述标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取的碱性磷酸酯酶。

5、根据权利要求4所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于所述毒死蜱抗原是使用活泼酯法或混合酸酐法将毒死蜱半抗原与载体蛋白偶联得到。

6、根据权利要求1或4所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于当标记酶为辣根过氧化物酶时，所述底物液为含有3,3',5,5'-四甲基联苯胺或邻苯二胺的pH5.0磷酸-柠檬酸缓冲溶液，所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的pH5.0磷酸-柠檬酸缓冲溶液，所述终止液为1~2mol/L硫酸溶液或2mol/L的氢氧化钠溶液；

当标记酶为细菌提取的碱性磷酸酯酶时，所述底物液为对硝基磷酸盐缓冲液，所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的pH5.0磷酸-柠檬酸缓冲溶液，所述终止液为1~2mol/L硫酸溶液或2mol/L的氢氧化钠溶液。

7、根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于所述毒死蜱标准溶液的浓度分别为：1mg/L、0.1mg/L、0.01mg/L、0.001mg/L、0.0001 mg/L 和 0mg/L。

8、根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于所述浓缩洗涤液为含0.5~1.5%吐温20的磷酸盐缓冲液，磷酸盐缓冲液pH7.4，浓度为0.1mol/L。

9、一种根据权利要求1所述酶联免疫试剂盒的使用方法，其特征在于包括以下步骤：

(1) 样品前处理；

(2) 使用试剂盒进行检测;

(3) 结果处理与分析。

10、根据权利要求9所述方法,其特征在于步骤(2)包括以下步骤:

(1) 将试剂盒从冷藏环境中取出,置于室温平衡;

(2) 将毒死蜱抗体工作液加入已包被有抗抗体的酶标孔内,轻拍混匀,孵育;

(3) 洗涤;

(4) 标准品或待测样品加入酶标板孔内,然后每孔加入酶标记毒死蜱抗原,轻拍混匀,孵育;

(5) 洗涤;

(6) 每孔加入等量的底物缓冲液与底物液,轻拍混匀,避光孵育;

(7) 每孔加入反应终止液,混合均匀,在波长 450nm 或 492nm 下,以空气为空白,酶标仪测定各孔吸光值。

检测毒死蜱残留的酶联免疫试剂盒及其使用方法

技术领域

本发明涉及酶联免疫检测技术领域，具体涉及一种检测农药毒死蜱残留的酶联免疫检测试剂盒及其使用方法。

背景技术

毒死蜱又名乐斯本，英文名称 chlorpyrifos，化学名称 0, 0-二乙基-0(3, 5, 6-三氯-2-吡啶基)硫逐磷酸酯，是由美国陶氏化学公司（Dow Chemical Co.）于 1965 年开发的有机磷酸酯类杀虫剂，是世界上应用最广泛的杀虫剂之一（Manclus, 1996）。我国也将其作为高毒有机磷农药的替代产品，生产量和使用量逐年上升。

毒死蜱影响大脑发育，对甲状腺系统产生作用，导致血液甲状腺素浓度降低，过量摄取可能会引起痉挛以及眩晕，尤其对儿童健康危害较大。美国近 30 年对市场销售的家庭常用杀虫剂毒死蜱进行了 3600 多项研究，发现接触高剂量的毒死蜱会导致视力模糊和记忆丧失等神经病变（Mattingly 等，2003；Christopher 等，1997）。

有鉴于此，发达国家对毒死蜱的使用进行了严格的规定，并不断提高毒死蜱在农产品中的残留限量。美国于 1996 年颁布的《食品质量保护法》中要求美国环保署（EPA）在 2006 年前对毒死蜱进行更为严格的评估，以进一步减少毒死蜱对人体带来的危害。2000 年 6 月美国环保局官员 Browner 宣布了在局部范围停止使用毒死蜱的命令，直至 2002 年，毒死蜱才成功地获得了美国环保署（EPA）的临时重新登

记资格认证(IRED)。获得临时重新登记资格认证后,毒死蜱保留了其所有的农业用途,但每日允许最大摄入量(ADI)减少到仅为原来的1/100(秦钰慧等,2000)。加拿大通过《食品及药物法规修正案草案》,作为对毒死蜱再评估第1阶段的结果,加拿大决定自2003年12月31日起不得在西红柿上使用含毒死蜱的产品,并将苹果、葡萄内毒死蜱的最大残留限量降至0.01mg/kg,来减少对急性饮食风险的担忧(加拿大食品及药物法规修正案草案[1341-毒死蜱],2003年12月31日)。欧盟对菠菜中毒死蜱的最高限量为0.05mg/kg,日本对毒死蜱的国家标准最为严格,其2002年4月公布的农残限量标准表中,其菠菜的毒死蜱限量为0.01mg/kg,国际食品法典委员会(CAC)对菠菜中毒死蜱残留限量为0.05mg/kg。我国最高残留限量国家标准为:粮食0.1 mg/kg;梨果,叶菜1 mg/kg;棉籽油0.05 mg/kg(GB 14873-94)。

在危害到人类身体健康的同时,毒死蜱残留超标的问题也严重影响我国农产品的出口,降低了我国农产品在国际市场上的竞争力,我国农产品因为毒死蜱残留超标被进口国拒绝、扣留、退货、索赔和终止合同的事件时有发生。我国每年有约70万吨、40多亿美元的各种加工蔬菜出口日本,但近几年受毒死蜱残留超标的影响,出口大受限制,损失惨重(《新闻周刊》,2004年10月2日)。

由此可见,有效控制毒死蜱残留超标问题已经到了刻不容缓的地步,同时要求开发快速有效的毒死蜱分析检测技术。

目前,检测毒死蜱残留的常规方法有气相色谱-质谱联用法(GC

—MS)和高效液相色谱法(HPLC),这些方法虽然灵敏精确,但需要昂贵的专业仪器,分析费时,成本较高。而酶联免疫分析(ELISA)快速检测技术因成本低、操作简单、速度快、一次检测样本量大、仪器化程度低,现已成为常用的筛选方法,但目前报道的毒死蜱免疫分析试剂盒的仍存在许多问题,比如稳定性差、操作步骤繁琐、检测灵敏度低等缺点,很难应用于毒死蜱的实际检测。因此,开发毒死蜱特异、灵敏、稳定,且适于现场大批量样品快速筛选的酶联免疫分析检测试剂盒对毒死蜱残留进行监控、保障人民群众身体健康具有重要的现实意义。

发明内容

本发明的目的是提供一种特异、灵敏、稳定、廉价高效,适合于检测环境和农产品中残留毒死蜱的酶联免疫试剂盒。

本发明的另一目的是提供利用上述酶联免疫试剂盒检测毒死蜱残留的方法。

为了实现上述目的,本发明采用如下测定原理:首先将抗抗体,即第二抗体,吸附于固体载体上;然后加入人工制备的抗毒死蜱抗体,抗毒死蜱抗体与抗抗体反应,从而也被吸附于固体载体上,通过洗涤除去过量的未吸附的抗体;再加入酶标毒死蜱抗原与待测样品,酶标抗原与待测样品同时竞争吸附在固相载体上的抗毒死蜱抗体,待测样品毒死蜱含量高时,则与毒死蜱抗体结合的酶标抗原就少,反之结合在毒死蜱抗体的酶标抗原就多,反应后加入底物进行显色加以测定,当毒死蜱抗体量一定时,加入的待测样品毒死蜱量越多,与毒死蜱抗

体结合的酶标抗原就越少，发色反应减弱，百分吸光度减低，反之，则发色反应增强，百分吸光度增高，因而根据已知量的毒死蜱的标准曲线和待检样品的百分吸光度，再根据百分吸光度与毒死蜱浓度之间的半对数关系作图即得标准曲线，并推算出待测样品中毒死蜱的浓度。

本发明的具体技术方案是：

提供一种检测农药毒死蜱残留的酶联免疫试剂盒，包含下列成分：

- (1) 包被抗抗体的酶标板；
- (2) 毒死蜱抗体工作液；
- (3) 酶标记毒死蜱抗原工作液；
- (4) 毒死蜱标准溶液；
- (5) 底物液；
- (6) 底物缓冲液；
- (7) 终止液；
- (8) 浓缩洗涤液。

所述酶标板是 96 或 40 孔酶标板，是利用能与抗毒死蜱抗体特异结合的第二抗体进行包被，第二抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体，并对微孔表面未吸附第二抗体的位点进行封闭。所用的包被液为 pH9.6、0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液，碳酸盐缓冲溶液含 1~2g 碳酸钠、2~4g 碳酸氢钠和双蒸水 1L，封闭液为 1~5%脱脂奶粉溶液。

所述毒死蜱抗体的制备，所用的免疫原为采用活泼酯法（DCC、

NHS)或混合酸酐法(氯甲酸异丁酯)将毒死蜱半抗原与载体蛋白共价偶联合成得到的,以免疫抗原免疫兔子或小鼠,制备毒死蜱多克隆抗体、利用杂交瘤技术制备毒死蜱单克隆抗体或利用基因工程方法制备基因工程抗体。收集抗血清、腹水、发酵液等,用辛酸硫酸铵沉淀纯化或过亲和层析柱进行纯化。

所述酶标记抗原是将酶与毒死蜱半抗原 O-乙基-O-氨基己酸基-O (3,5,6-三氯-2-吡啶基)硫逐磷酸酯(AR1)共价偶联得到的,所用标记酶可为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,本发明优选辣根过氧化物酶,且采用混合酸酐法进行标记。

所述毒死蜱标准溶液的浓度为:1mg/L、0.1mg/L、0.01mg/L、0.001mg/L、0.0001 mg/L 和 0mg/L。

所述底物显色液:当标记酶为辣根过氧化物酶时,底物液为含有 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)或邻苯二胺(OPD)的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液,底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液,所述终止液为 1~2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液;

当标记酶为细菌提取的碱性磷酸酯酶时,所述底物液为对硝基磷酸盐缓冲液,所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液,所述终止液为 1~2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液。

所述浓缩洗涤液为含 0.5~1.5%吐温 20 的磷酸盐缓冲液,磷酸盐缓冲液 pH7.4,浓度为 0.1mol/L,为正常使用浓度的 15~25 倍。

可以作为固定抗抗体的载体物质较多,例如聚苯乙烯、硝酸纤维素、聚乙烯、聚丙烯、聚丙烯酰胺、交联葡萄糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等。该载体的形式可以为凹孔、纸片、小珠等。

本发明所述抗原抗体及酶标记物的制备方法陈述如下:

(1) 毒死蜱抗原的合成

毒死蜱半抗原的合成:以三氯硫磷为起始原料,分别用乙醇、3,5,6-三氯吡啶酚、6-氨基己酸取代其3个氯原子,从而合成半抗原O-乙基-O-氨基己酸基-O(3,5,6-三氯-2-吡啶基)硫逐磷酸酯(AR1)。

毒死蜱抗原的合成:将半抗原AR1与牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、石孔雀蛋白(KLH)等载体蛋白,通过碳二亚胺法(EDC)、活泼酯法(DCC、NHS)、混合酸酐法(氯甲酸异丁酯)进行偶联得到包被抗原与免疫原。

(2) 酶标记抗原的制备

采用混合酸酐法将辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酶与毒死蜱半抗原AR1偶联得到酶标记毒死蜱抗原。

(3) 包被用抗抗体的制备

抗抗体是以羊为免疫动物,以鼠源性抗体或兔源性抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫得到的羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体。

(4) 毒死蜱单克隆抗体的制备

动物免疫程序:采用Balb/c小鼠作为免疫动物,以毒死蜱免疫原对小鼠进行免疫,可以得到血液里含有毒死蜱特异性抗体的小鼠脾

脏。

细胞融合与克隆化：取免疫 Balb/c 小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合，采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液，筛选阳性孔。利用有限稀释法或显微细胞挑取法对阳性孔进行克隆化，得到单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

细胞冻存和复苏：取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液，分装于冻存管，在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管，立即放入 37℃ 水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

单克隆抗体的制备与纯化：采用体内诱生法，将 Balb/c 8 周龄小鼠腹腔注入灭菌石蜡油，7~14 天后腹腔注射杂交瘤细胞，7~10 天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸铵法或亲和层析法进行腹水纯化，小瓶分装，-20℃ 保存。

（5）毒死蜱多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以毒死蜱与载体蛋白偶联物为免疫原对新西兰大白兔进行免疫，多次免疫后测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

（6）毒死蜱基因工程抗体的制备

基因工程抗体主要指小分子抗体，包括：由完整的轻链和 Fd 构成的 Fab，由 VH 和 VL 构成的 Fv，ScFv（单链抗体，VH 和 VL 之间由一条连接肽连接而成），单域抗体（仅由 VH 组成）等经基因工程技术改造后的抗体。

制备方法为：提取毒死蜱单克隆细胞或经毒死蜱免疫原免疫后的

小鼠脾细胞的 RNA，反转录为 cDNA，设计抗体轻重链扩增引物，利用 PCR 技术扩增出抗体的轻重链基因，插入适当的表达质粒，在大肠杆菌中表达，利用免疫亲和方法进行纯化，纯度由 SDS-PAGE 电泳鉴定。

本发明还提供了使用所述试剂盒定性、定量检测环境与农产品中毒死蜱残留量的方法，包括以下步骤：

- (1) 样品前处理；
- (2) 用试剂盒进行检测；
- (3) 分析检测结果。

本发明提供样品前处理方法为：

水样：清澈水样可直接用于 ELSIA 检测，如果混浊则需离心后取上清进行检测。

土样：取 10g 土壤用 20~40mL 甲醇提取三次，合并提取液，浓缩至 1mL，然后用 PBST 稀释定容至 10mL，进行 ELISA 分析。

蔬菜样品：取蔬菜样品用粉碎机绞碎后称取 10g，20~40mL 甲醇提取三次，合并提取液，浓缩至 1mL，用 PBST 定容至 10mL，取样进行 ELISA 分析。

血液：取人体血液，加抗凝素后直接用 ELISA 法进行分析。

洗胃液（2%碳酸氢钠溶液）：取 10mL 洗胃液，用稀 HCl 调 PH 值到中性后即可用 ELISA 法进行分析。

呕吐物：取样品研碎，离心取上清用 ELISA 法进行分析。

步骤（2）所述使用试剂盒检测步骤为：

- (1) 将试剂盒从冷藏环境中取出，置于室温平衡；

(2) 将毒死蜱抗体工作液加入已包被有抗抗体的酶标孔内，轻拍混匀，孵育；

(3) 洗涤；

(4) 标准品或待测样品加入酶标板孔内，然后每孔加入酶标记毒死蜱抗原，轻拍混匀，孵育；

(5) 洗涤；

(6) 每孔加入等量的底物缓冲液与底物液，轻拍混匀，避光孵育；

(7) 每孔加入反应终止液，混合均匀，在波长 450nm 或 492nm 下，以空气为空白，酶标仪测定各孔吸光值。

本发明提供的检测结果计算与分析方法为：

以所获标准样品吸光值的平均值计算百分吸光度值，以百分吸光度值为纵坐标，毒死蜱浓度的半对数为横坐标绘制标准曲线，求出直线方程。用同样的方法计算样品溶液的百分吸光度值，根据方程式求出对应样品的毒死蜱浓度。所述百分吸光度值的计算式为：

$$\text{百分吸光度值}(\%) = (B / B_0) \times 100$$

其中，B 为标准溶液的平均吸光值， B_0 为 0 浓度标准溶液的平均吸光度值。

检测结果的分析还可以利用计算机专业软件进行计算与分析。该试剂盒对毒死蜱线性检测范围为 0.0001~1mg/L，最低检测限为 0.1ng/mL。

与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：

1、本发明的酶联免疫试剂盒采用第二抗体预包被酶标板，节约了毒死蜱抗体的用量，而且克服了直接包被第一抗体不利于试剂盒长期保存的问题；

2、本发明的酶联免疫试剂盒利用抗抗体与毒死蜱抗体特异反应将毒死蜱抗体固定于固相表面，不仅对毒死蜱抗体起到了纯化的作用，而且由于抗抗体与毒死蜱抗体的反应发生在毒死蜱抗体的 Fc 段，所以经过反应后毒死蜱抗体的 Fv 段全部暴露于固相表面，将更有利于其与毒死蜱的特异反应，大大提高了试剂盒的检测灵敏度与精密程度；

3、本发明的酶联免疫试剂盒采用高亲合力、高特异性的抗毒死蜱抗体，提高了检测的灵敏度与准确度，该试剂盒对毒死蜱线性检测范围为 0.0001~1mg/L，最低检测限为 0.1ng/mL；

4、本发明的酶联免疫试剂盒能用于水、土壤、农产品等样品中毒死蜱残留的检测，操作简单、快速，能同时检测大批量的样品，成本远低于传统毒死蜱检测方法，适用于农药毒死蜱残留现场监控的痕量分析，具有重要现实意义。

附图说明

图 1 为标准曲线；

图 2 试剂盒的直观示意图。

具体实施方式

下面结合附图和具体实施例来进一步详细说明本发明。

实施例 1 抗原的制备

毒死蜱抗原的制备:

- a. 将 $50 \mu\text{mol/L}$ 毒死蜱半抗原溶解在 1mL 的 DMF 中, 然后在该溶液中加入等摩尔的 DCC 和 NHS, 让其在室温下反应过夜;
- b. 离心, 取上清液 $800 \mu\text{L}$, 缓慢加入到 4mL 15mg/mL 的 BSA 或 OVA 载体蛋白碳酸缓冲溶液中, 然后在磁力搅拌下反应 4h ;
- c. 待反应完成后, 装入透析袋, 先用蒸馏水透析 2 次, 然后用 0.8% 生理盐水透析, 得产物;
- d. 采用 1998 年陈新建等公开的紫外扫描测定结合比的方法测定结合比, 最后将抗原浓缩保存或冻干保存得到毒死蜱免疫原和包被原, 分装保存于 -20°C 的冰箱中。

实施例 2 抗体的制备

毒死蜱鼠单克隆抗体制备:

动物免疫程序: 采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物, 以毒死蜱半抗原与牛血清白蛋白偶联物为免疫原, 免疫剂量为 $60 \mu\text{g/只}$, 首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂, 腹腔注射, 间隔 3 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化, 加强免疫一次, 四免后腹腔加强免疫一次, 3 天后取脾细胞。

细胞融合与克隆化: 取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞, 按 4: 1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液, 筛选阳性孔。利用显微克隆法对阳性孔进行克隆化, 直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

细胞冻存和复苏: 取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成

5×10^6 个/mL 的细胞悬液，分装于冻存管，在 -70°C 超低温冰箱中长期保存。复苏时取出冻存管，立即放入 37°C 水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

单克隆抗体的制备与纯化：采用体内诱生法，将 Balb/c 8 周龄小鼠腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^6 个/只，14 天后采集腹水。用免疫层析法进行腹水纯化，小瓶分装， -20°C 保存。

实施例 3 辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶的提取

1、辣根过氧化物酶的提取

a. 水提取：称取 20 千克已洗干净的鲜辣根或辣根皮，切成小块，在粉碎机中绞碎。碎渣浆加 10 千克水在低温下搅拌浸提 8 小时，以 3000 转/分速度离心 10 分钟，收集上清液。

b. 硫酸铵分级分离：每升滤液加 226 克硫酸铵粉末，边加边搅拌，置室温下过夜。次日吸取上清液，再按每升上清液加 258 克硫酸铵粉末，随加随搅拌，待硫酸铵完全溶解后，置冷室过夜。次日吸去上清液，沉淀部分在冷冻离心机中以 13000 转/分离心 20 分钟，弃去上清液，收集沉淀。将沉淀溶于 200~300 毫升蒸馏水中，分装于透析袋中，在流动水中透析 1~2 天，直至透出的水加入氯化钡溶液无沉淀生成为止。然后再在蒸馏水中透析 8 小时。合并透析液，在冷冻离心机中以 4000 转/分离心 15 分钟，收集上清液。

c. 丙酮分级分离：将上清液倒入烧杯并置冰盐浴中，在不断搅拌下，用滴管沿杯壁加入等体积预冷至 -15°C 的丙酮，在冷冻离心机中以 4000 转/分离心 15 分钟，收集上清液，再加入原上清液体积 0.8

倍的一15℃丙酮，离心（条件同上）收集沉淀。将沉淀溶于少量蒸馏水中，透析（方法同上）除去丙酮，即得粗 HRP。

d. 精制：每升粗酶液加入 1 毫升 1 摩尔硫酸锌溶液，在冷冻离心机中以 5000 转/分离心 10 分钟，收集上清液，分装于透析袋内，于流水中透析除硫酸锌，约需 1 天，然后在蒸馏水中透析 8 小时。将透析液合并，进行真空干燥即得精制 HRP。产品呈米黄色纤维状松软物。

2、碱性磷酸酶

利用产生碱性磷酸酯酶的 *E. Coli* 1, 317 菌株发酵培养，发酵液经 8000r/min 离心 10min 后，沉淀的菌体经 5×10^{-4} M EDTA—0.03M pH 8.0 Tris—0.5M 蔗糖高渗液处理后用溶菌酶破壁，上清酶液经 DEAE 纤维素搅拌吸附和洗脱，热处理和 Sephadex G-100 分子筛层析纯化。

实施例 4 酶标记毒死蜱抗原的制备

利用混合酸酐法，辣根过氧化物酶 HRP 标记半抗原 O-乙基-O-氨基己酸基-O (3,5,6-三氯-2-吡啶基)硫逐磷酸酯 (AR1)，具体方法为：

a. 称取 10mg 的 HRP (250nmol) 于玻璃容器中，用 0.5mL 的去离子水溶解，加入 2 μ L 双蒸的三正丁胺（或 N-乙基吗啉），485 μ L 的 DMF，轻轻混匀，冰浴保存。

b. 称取一定量的半抗原，加入 275 μ L DMF 溶解，加入 1.2 摩尔比的三正丁胺（或 N-乙基吗啉），加入 1.2 摩尔比的氯甲酸异丁酯，

活化 2~5min。

c. 将活化产物加入到 HRP 溶液中，控制半抗原与 HRP 的摩尔比为 2:1，冰浴反应 1h，不时摇荡一下。

d. 将反应物过 Sephadex G25 柱 (1cm×45cm)，用 0.1M、pH7.0、含 0.15M NaCl 的 PBS 缓冲液洗脱，收集蛋白峰，分装冻存备用。

实施例 5 酶联免疫试剂盒组分的配制

(1) 浓缩洗涤缓冲液的配制：含 0.5~1.5%吐温 20 的磷酸盐缓冲液，磷酸盐缓冲液 pH7.4，浓度为 0.1mol/L，为正常使用浓度的 15~25 倍。

(2) 封闭液的配制：脱脂奶粉 1.0~5.0 g 溶于 100mL 蒸馏水。

(3) 底物缓冲液的配制：30%过氧化氢 30 μ L 溶于 19mL 的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液中，4℃保存。磷酸-柠檬酸缓冲液：0.2M Na_2HPO_4 25.7mL，0.1M 柠檬酸 24.3mL，加蒸馏水 50mL。

(4) 底物液的配制：将 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 80mg 溶于 10mL pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液中，4℃保存。磷酸-柠檬酸缓冲液：0.2M Na_2HPO_4 25.7mL，0.1M 柠檬酸 24.3mL，加蒸馏水 50mL。

(5) 酶标板微孔板的包被：抗抗体用 pH9.6，0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液，稀释成 0.1~1 μ g/mL，其中碳酸盐缓冲溶液含 1~2g 碳酸钠和 2~4g 碳酸氢钠以及双蒸水 1L。在酶标板的每孔加 100 μ L，37℃包被 1h 后 4℃下包被过夜，倾去包被液，用 PBST 洗涤 3 次，拍干，然后在每孔中加入 200 μ L 1.0~5.0%脱脂奶粉，放入 37℃温箱中 1h 后用 PBST 洗涤 3 次，干燥后封入铝箔袋中 4℃保存。

(6) 毒死蜱标准溶液的配制：准确称取毒死蜱标样 10mg，溶于 10mL 甲醇中，然后用洗涤液 10 倍梯度稀释分别配制 1mg/L、0.1mg/L、0.01mg/L、0.001mg/L、0.0001 mg/L 毒死蜱溶液，另外配制 0mg/L 对照样，4℃保存。

(7) 试剂分装：各种试剂按要求配制，测定合格后无菌分装。毒死蜱抗体工作液 7mL/瓶，酶标记毒死蜱抗原工作液 7mL/瓶，毒死蜱标准样品 1mL/瓶，底物液 7mL/瓶，底物缓冲液 7mL/瓶，终止液 7mL/瓶，浓缩洗液 50mL/瓶。分装后贴标签，注明批号和有效期，4℃保存。

(8) 试剂盒的组装：分别将可拆卸包被好抗抗体的微孔板 1 块，毒死蜱抗体工作液、酶标记毒死蜱抗原工作液、底物液、底物缓冲液、终止液、浓缩洗液各 1 瓶，毒死蜱标准溶液 6 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。

实施例 6 酶联免疫试剂盒组分的配制

实验步骤同实施例 5，不同的是采用细菌提取的碱性磷酸酯酶为标记酶，所述底物液为对硝基磷酸盐缓冲液，所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液，所述终止液为 1~2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液，按照实验室常规方法配制。

实施例 7 组建检测毒死蜱的酶联免疫试剂盒，包含下述组分：

(1) 包被毒死蜱抗抗体的 96 孔酶标板，或根据产品规格需要选择 40 孔酶标板；

- (2) 毒死蜱单克隆抗体工作液, 7mL/瓶;
- (3) 辣根过氧化物酶标记毒死蜱抗原, 7mL/瓶;
- (4) 毒死蜱标准品溶液 6 瓶, 浓度分别为 1mg/L、0.1mg/L、0.01mg/L、0.001mg/L、0.0001 mg/L、0mg/L, 1mL/瓶;
- (5) 底物缓冲液, 7mL/瓶;
- (6) 底物液, 7mL/瓶;
- (7) 终止液, 7mL/瓶;
- (8) 浓缩洗涤液, 50mL/瓶;
- (9) 使用说明书, 1 份;
- (10) 盖板膜, 2 张;
- (11) 自封袋 (含干燥剂), 1 个。

作为一个具体的试剂盒样板, 本发明提供了如附图 2 所示的一个试剂盒, 图 2 中, 1: 酶标记抗原溶液; 2: 底物缓冲液; 3: 包被好抗抗体的微孔板; 4: 毒死蜱标准溶液; 5: 使用说明书; 6: 毒死蜱抗体工作液; 7: 底物液; 8: 终止液。

实施例 8 待测样品前处理

水样: 清澈水样可直接用于 ELSIA 检测, 如果混浊则需离心后取上清进行检测。

土样: 取 10g 土壤用 20~40mL 甲醇提取三次, 合并提取液, 浓缩至 1mL, 然后用 PBST 稀释定容至 10mL, 进行 ELISA 分析。

蔬菜样品: 取蔬菜样品用粉碎机绞碎后称取 10g, 20~40mL 甲醇提取三次, 合并提取液, 浓缩至 1mL, 用 PBST 定容至 10mL, 取样进

行 ELISA 分析。

血液：取人体血液，加抗凝素后直接用 ELISA 法进行分析。

洗胃液（2%碳酸氢钠溶液）：取 10mL 洗胃液，用稀 HCl 调 PH 值到中性后即可用 ELISA 法进行分析。

呕吐物：取样品研碎，离心取上清用 ELISA 法进行分析。

实施例 9 使用试剂盒进行检测的方法

（1）将试剂盒从冷藏环境中取出，置于室温（20~24℃）平衡 30min 以上，将足够标准和样品所用数量的条板固定于支架，标准和样品做两个平行实验，按顺序编号。

（2）在酶标孔内加入 100 μ L 毒死蜱抗体工作液，37℃孵育 20min；

（3）倒出孔中的液体，将微孔架倒置在吸水纸上拍打，每轮洗板拍打 3 次，以保证完全除去孔中的液体。用 250 μ L 蒸馏水充入孔中，再次倒掉微孔中的液体，再重复操作 3 遍。

（4）在标准品孔加入 50 μ L 标准品，样品孔加入 50 μ L 待测样品。然后每孔加入 50 μ L 酶标记毒死蜱抗原，轻拍混匀。盖上盖板膜，在 37℃孵育 30min。

（3）倒出孔中的液体，将微孔架倒置在吸水纸上拍打，每轮洗板拍打 3 次，以保证完全除去孔中的液体。用 250 μ L 蒸馏水充入孔中，再次倒掉微孔中的液体，再重复操作 3 遍。

（4）每孔加入 100 μ L 显色液（将底物缓冲液与底物液等体积混合），轻拍混匀，盖上盖板膜，暗处 37℃孵育 15min。

（5）加入 50 μ L 反应终止液到微孔中。混合好在波长 450nm 或

492nm, 以空气为空白, 测定各孔吸光值, 必须在加入终止液后 60min 内读取吸光值。

检测结果计算与分析:

以所获标准样品吸光值的平均值计算百分吸光度值, 以百分吸光度值为纵坐标, 毒死蜱标准溶液浓度的半对数为横坐标绘制标准曲线, 求出直线方程。用同样的方法计算样品溶液的百分吸光度值, 根据方程式求出对应样品的毒死蜱浓度。所述百分吸光度值的计算式为:

$$\text{百分吸光度值(\%)} = (B/B_0) \times 100$$

其中, B 为标准溶液或样品的平均吸光值, B_0 为 $0 \mu\text{g/L}$ 标准溶液的平均吸光度值。

检测结果的分析还可以利用计算机专业软件进行计算与分析。所述试剂盒对毒死蜱线性检测范围为 $0.0001 \sim 1\text{mg/L}$, 最低检测限为 0.1ng/mL 。

实施例 10 试剂盒标准曲线测定

利用毒死蜱标样溶液进行反应, 根据实验结果绘制标准曲线, 见附图 1, 直线方程为 $Y = -14.253X + 9.4795$, 百分吸光度值(%)与毒死蜱浓度的对数值在浓度 $0.0001 \sim 1\text{mg/L}$ 范围内呈显著的线性关系, 相关系数为 $R^2 = 0.9908$ 。

实施例 11 试剂盒精密度与准确度试验

1、标准品溶液重复性试验

从 3 批按照实施例 5 (5) 中的方法制备的酶标板中, 各抽出 20

个微孔，测定 0.001mg/L 标准溶液的吸光度值（OD 值），重复 20 次，计算变异系数 CV%，结果见表 1。

表 1 标准品溶液重复性试验

样品	浓度 mg/L	第 1 批	第 2 批	第 3 批	批间 CV%
		CV%	CV%	CV%	
标准品	0.001	3.2	3.1	4.1	5.6

结果表明试剂盒标准品检测的批内变异系数范围在 3.1~4.1% 之间，批间变异系数为 5.6%。

2、样本重复性与准确度试验

准确度是指测得值与真值的符合程度，在 ELISA 测定中，准确度常以回收率表示，精密度常以变异系数来表示。在空白水样、蔬菜、土壤中，将毒死蜱添加至终浓度为 1 μ g/L (μ g/kg)、10 μ g/L (μ g/kg)，每个浓度各 10 个平行，测定 3 批。计算平均值、添加回收率及批内与批间变异系数。结果见表 2。

表 2 样本重复性与准确度试验结果

样品	添加 浓度 μg/L	含量	第 1 批		第 2 批			第 3 批			批间 CV%
			回收率 %	CV%	含量	回收率 %	CV%	含量	回收率 %	CV%	
水样	1	0.93	93.0	3.9	1.03	103	3.1	0.94	94.0	3.9	11.3
	10	10.2	102	2.3	9.5	95.0	2.7	10.4	104	3.3	9.3
蔬菜	1	0.81	81.0	7.8	0.80	80.0	8.9	0.85	85.0	7.9	16.6
	10	8.6	86.0	7.3	8.35	83.5	8.1	8.63	86.3	8.9	15.1
土壤	1	0.71	71.0	8.3	0.73	73.0	9.6	0.75	75.0	7.8	17.2
	10	8.1	81.0	8.2	7.47	74.7	9.4	8.12	81.2	8.3	15.8

结果表明水样、蔬菜、土壤样本的添加回收率在 71.0~104% 之

间，批内变异系数在 2.3~9.6%之间，批间变异系数在 9.3~17.2%之间。

实施例 12 保存期试验

(1) 将试剂盒放置于 2~8℃，分别取 0、2、4、6、8、9、10、11 和 12 个月的试剂盒，对毒死蜱标准样品 (0.001mg/L) 的吸光度值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

(2) 将试剂盒在 37℃保存的条件下放置 12 天，每天对毒死蜱标准样品 (0.1 μg/L) 的吸光度值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

(3) 将试剂盒在 -20℃冰箱保存 12 天，每天对毒死蜱标准样品 (0.001mg/L) 的吸光度值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

从结果可看出，经过三种条件保存试验，毒死蜱标准样品 (0.001mg/L) 的吸光度值下降小于 5%，且 OD 不低于 1.5；50%抑制率在 1.0~10 μg/L 之间；添加回收率在 70~120%之间；批内变异系数小于 10%；各项指标均符合质量要求，因此，试剂盒可以在 2~8℃保存 12 个月。

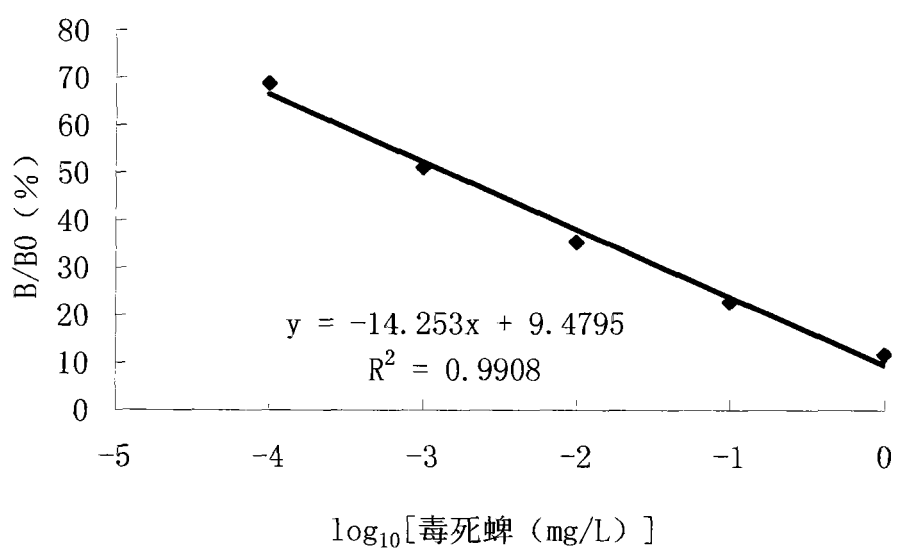


图 1

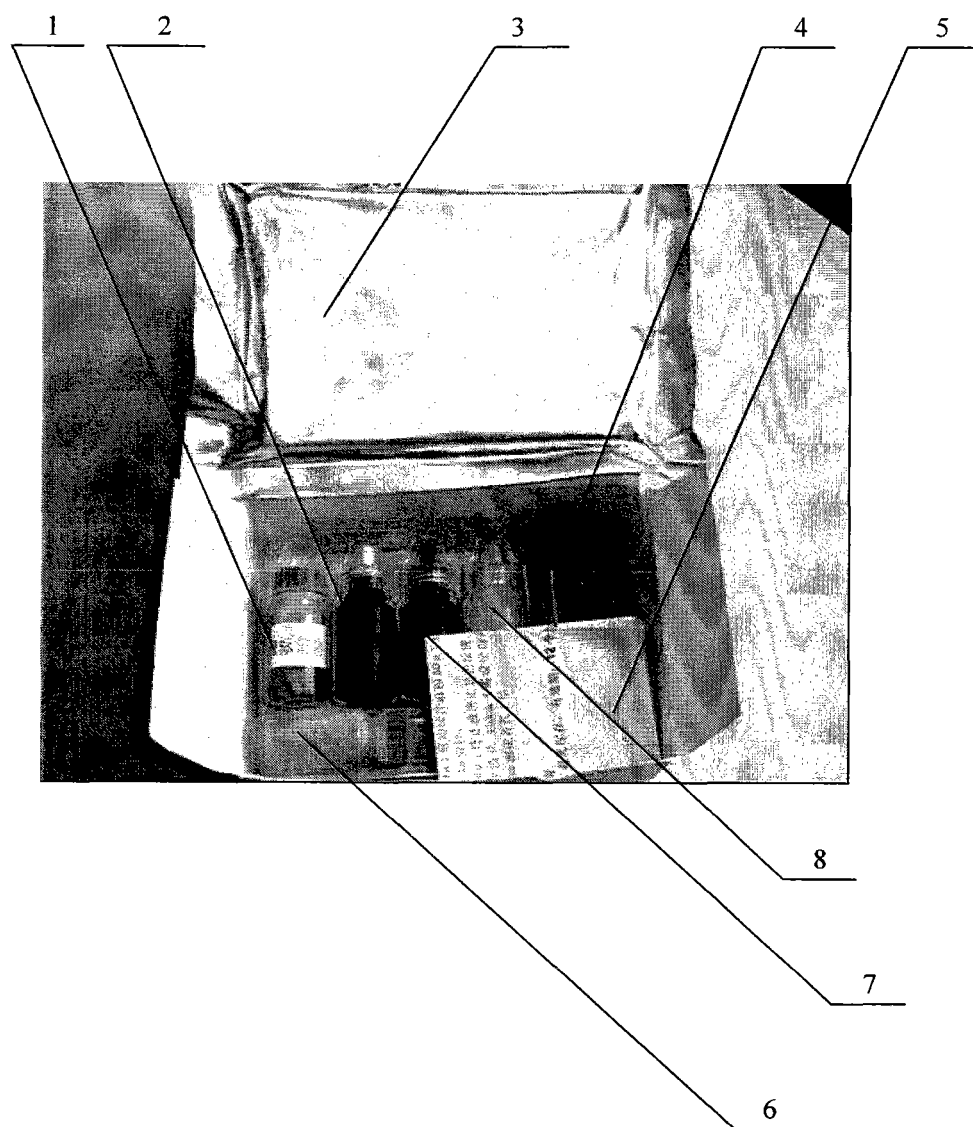


图 2

专利名称(译)	检测毒死蜱残留的酶联免疫试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN101241135A	公开(公告)日	2008-08-13
申请号	CN200810025907.8	申请日	2008-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	孙远明 杨金易 雷红涛 吴青 王弘 肖治理 沈玉栋		
发明人	孙远明 杨金易 雷红涛 吴青 王弘 肖治理 沈玉栋		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535 G01N33/577		
代理人(译)	林丽明 任重		
其他公开文献	CN101241135B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测农药毒死蜱残留的酶联免疫试剂盒，包括：包被有抗抗体的酶标板，毒死蜱抗体工作液、酶标记毒死蜱抗原工作液、毒死蜱标准溶液、底物液、底物缓冲液、反应终止液和浓缩洗涤液。本发明还公开了使用所述试剂盒检测毒死蜱的方法，包括样品的前处理，利用试剂盒进行检测，结果的处理与分析。本发明采用毒死蜱抗体经与抗体反应被吸附于固相载体上的间接竞争酶联免疫吸附分析技术，试剂盒的灵敏度与稳定性大大增强，非常适合环境与农产品中痕量毒死蜱残留的检测，具有重要的现实意义。

