



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105572342 A

(43) 申请公布日 2016.05.11

(21) 申请号 201410537497.0

(22) 申请日 2014.10.13

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯国家科技园 B11 栋 3 楼

(72) 发明人 杜道林 洪霞 刘静

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测乐果的化学发光酶联免疫分析法

(57) 摘要

本发明公开了一种乐果的化学发光酶联免疫检测试剂盒,包括盒体,设在盒体内的酶标板和设在盒体内的试剂;其特征在于,所述酶标板的各孔包被有包被抗原即乐果类母核与载体蛋白的偶联物;所述试剂包括:乐果类单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体、乐果类系列标准溶液、浓缩磷酸盐缓冲液、浓缩洗涤液、化学发光液;本发明的化学发光酶联免疫检测试剂盒具有高灵敏度、简便快速、准确度高、检测药物种类多的特点,与传统的比色 ELISA 法比较,操作时间大幅度减少;该方法可直接用于检测农作物(大豆、水稻、小麦、大麦等)中的乐果含量。

1. 一种乐果的化学发光酶联免疫检测试剂盒,包括盒体,设在盒体内的酶标板和设在盒体内的试剂;其特征在于,所述酶标板的各孔包被有以乐果母核与卵清蛋白偶联制成的包被抗原;所述试剂包括:乐果类单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体、乐果类系列标准溶液、浓缩磷酸盐缓冲液、浓缩洗涤液、化学发光液。

2. 根据权利要求1所述乐果类的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述酶标板为乳白色不透明聚苯乙烯 96 孔化学发光酶标板。

3. 根据权利要求1所述乐果类的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述包被抗原浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ 。

4. 根据权利要求1所述乐果类的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述乐果单克隆抗体在工作浓度为 $1:64000$ 。

5. 根据权利要求1所述乐果类的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述乐果的单克隆抗体是由乐果母核与牛血清蛋白偶合制成的偶联物作为免疫原免疫 Balb/c 小鼠制备获得。

6. 根据权利要求1所述乐果的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述乐果系列标准溶液浓度分别为: 0mg/kg , 0.1mg/kg , 0.3mg/kg , 0.9mg/kg , 2.7mg/kg 和 8.1mg/kg 。

7. 根据权利要求1所述乐果的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述浓缩磷酸盐缓冲液是每升含 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.74g 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 32.6g 的水溶液。

8. 根据权利要求1所述乐果的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤溶液是含有体积分数 0.05% 吐温-20 的 $\text{pH} = 7.4$, 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液。

9. 根据权利要求1所述乐果类的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述化学发光液A液为鲁米诺含量为 0.01M 、对甲苯酚含量为 0.001M $\text{pH}8.8$ 的三(羟甲基)氨基甲烷溶液;B液为 100mL 溶液含柠檬酸 2.1g , 无水 Na_2HPO_4 2.82g , 0.75% 的过氧化氢脲 0.64mL 的溶液,所述百分比为质量百分比。

一种检测乐果的化学发光酶联免疫分析法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种酶联免疫检测试剂盒,尤其涉及一种乐果的化学发光酶联免疫检测试剂盒。

背景技术

[0002] 乐果是内吸性有机磷杀虫、杀螨剂。杀虫范围广,对害虫和螨类有强烈的触杀和一定的胃毒作用。在昆虫体内能氧化成活性更高的氧乐果,其作用机制是抑制昆虫体内的乙酰胆碱脂酶,阻碍神经传导而导致死亡,具有致癌性、致突变型和致畸性,因此安全问题受到高度重视。

[0003] 目前,检测乐果的方法主要有:高效液相色谱法(HPLC)、色/质联用分析法(LC-MS)、液/质联用分析法(LC-MS/MS)。薄层色谱法的缺陷是:操作过程复杂,时间长;操作人员需要经过专业培训;影响分析的干扰因素较多,结果重复性差。放射免疫法,高效液相色谱法、色/质连用分析法、液/质联用分析法这些理化方法的缺陷是仪器设备昂贵,样品前处理复杂,费时,费力,不易普及,检测费用高,特别是放射免疫法还需要配备放射源,有一定危险性。鉴于此,建立一种有效、快速、简单、灵敏的检测蔬菜中乐果含量的方法具有重要意义。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种乐果的化学发光酶联免疫检测试剂盒。该试剂盒具有检测灵敏度高、应用灵活、方便的特点。

[0005] 本发明所述乐果的化学发光酶联免疫检测试剂盒,包括盒体,设在盒体内的酶标板和设在盒体内的乐果系列标准溶液、酶标羊抗兔抗体、乐果抗体、发光溶液、洗涤溶液、包被溶液及封闭溶液;其特征在于:

所述酶标板的各孔包被有以乐果与卵清蛋白偶合制成的包被抗原,其中包被抗原浓度优选 $10 \mu\text{g/mL}$ 。

[0006] 所述卵清蛋白的分子量范围优选 $6.7\text{KDa} \sim 6.8\text{KDa}$ 。

[0007] 所述乐果系列标准溶液分别是 0mg/kg , 0.1mg/kg , 0.3mg/kg , 0.9mg/kg , 2.7mg/kg 和 8.1mg/kg 所述酶标羊抗兔抗体为辣根过氧化物酶-羊抗兔 IgG 原液,其工作浓度优选为 1:1000。

[0008] 所述乐果抗体是由乐果与分子量范围是 $6.7\text{KDa} \sim 6.8\text{KDa}$ 的牛血清蛋白偶合制成的人工免疫原免疫动物制得的多克隆抗体,其工作浓度优选为 1:1000。

[0009] 所述发光液是 0.01M 鲁米诺与 0.001M 对甲苯酚的三(羟甲基)氨基甲烷溶液($\text{pH} = 8.8$)和 $3/10000$ (体积比) H_2O_2 的混合液。所述鲁米诺为发光底物,对甲苯酚为发光增强剂。

[0010] 所述洗涤溶液是含有体积分数 0.05% 吐温-20 的 $\text{pH} 7.5$ 、 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液。

[0011] 所述包被溶液是每升水中含 1.59g 碳酸钠和 2.53g 碳酸氢钠的溶液, pH 为 9.5 。

[0012] 所述封闭溶液是每升洗涤溶液中含 10g 卵清蛋白 (OVA, ovalbumin, 也称鸡卵清白蛋白或鸡卵白蛋白, 由 386aa 组成, 分子量约 43Kd) 且加入重量分数 0.5% NaN_3 的溶液。

[0013] 本发明试剂盒最大检测范围为 0.1mg/kg~8.1mg/kg。

[0014] 本发明试剂盒中涉及的乐果标准溶液、酶标羊抗兔抗体溶液、乐果抗体溶液、发光溶液及洗涤溶液及其配方对本发明试剂盒检测的灵敏度影响很大;其中各溶液的主要成分及其配制方法是:

1、乐果标准溶液:以常规方法配制浓度分别为 0mg/kg, 0.1mg/kg, 0.3mg/kg, 0.9mg/kg, 2.7mg/kg 和 8.1mg/kg 的乐果标准溶液;

2、酶标羊抗兔抗体溶液:酶标羊抗兔抗体为辣根过氧化物酶-羊抗兔 IgG 原液,使用时用洗涤溶液配制成 1:1000 的工作浓度;

3、乐果抗体溶液:乐果抗体是用人工免疫抗原免疫动物制得的多克隆抗体,将所得乐果抗体用洗涤溶液稀释成 1:1000 的工作浓度;

4、发光溶液:是 0.01M 鲁米诺与 0.001M 对甲苯酚的三(羟甲基)氨基甲烷溶液 ($\text{pH} = 8.8$) 和 3/10000 (体积比) H_2O_2 的混合液;

5、洗涤溶液:指含有体积分数 0.05% 吐温-20 的 $\text{pH} 7.5$ 、0.1mol/L 磷酸盐缓冲液;

6、包被溶液:1.59g 碳酸钠和 2.53g 碳酸氢钠溶于 1L 水中,调节 pH 为 9.5;

7、封闭溶液配制:10g OVA 溶于 1L 洗涤溶液中,再加入重量比为 0.05% 的 NaN_3 。

[0015] 本发明所述酶标板的制备:

本发明所述酶标板的包被方法是采用乐果-OVA 在设定的包被溶液中,以设定的浓度,在 4℃ 中过夜反应包被。

[0016] 本发明采用的是 pH 为 9.5 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液。本发明酶标板中所包被的乐果-卵清蛋白 (OVA) 在碱性环境下可以很好的结合在微孔板塑料表面上,可以经受多次洗板,采用的包被抗原浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0017] 包被好的酶标板可以用封闭溶液封闭,封闭液中惰性蛋白优选卵清蛋白 (OVA),需加入 NaN_3 防止变质。

[0018] 乐果抗体溶液和酶标羊抗兔抗体溶液的制备:

本发明中乐果抗体溶液、酶标羊抗兔抗体溶液浓度是决定本发明中莱克多巴胺酶联免疫测试试剂盒测定范围及灵敏度的重要因素。

[0019] 本发明中涉及的乐果抗体溶液可以用洗涤溶液配制成浓度为 0.1~8.1mg/kg 溶液;或用洗涤溶液稀释成 1:1000 的工作浓度。

[0020] 本发明中涉及的酶标羊抗兔抗体溶液优选洗涤溶液配制的浓度为 1:1000。

[0021] 按照上述乐果抗体溶液浓度和酶标羊抗兔抗体溶液浓度制备的试剂盒可以达到很好的线性范围 (标准线范围可以达到 0.1mg/kg~8.1mg/kg) 及和好的灵敏度 (0.2mg/kg)。

[0022] 发光溶液的配制:

本发明采用辣根过氧化物酶标记底物发光系统,主要是鲁米诺-过氧化氢系统。

[0023] 所述发光液是 0.01M 鲁米诺与 0.001M 对甲苯酚的三(羟甲基)氨基甲烷溶液 ($\text{pH} = 8.8$) 和 3/10000 (体积比) H_2O_2 的混合液。所述鲁米诺为发光底物,对甲苯酚为发光增强剂。

[0024] 本发明的原理是将抗体-抗原反应的高度特异性与酶催化的高度灵敏性结合起

来,利用酶催化底物的化学发光反应检测产物浓度。

[0025] 本发明的化学发光酶联免疫检测试剂盒具有灵敏度高、简便快速、准确的点,与传统的比色 ELISA 法比较,灵敏度可以提高一个数量级。有望在农作物产品中的乐果残留检测中发挥重要作用。

附图说明

[0026] 图 1 为乐果的标准曲线图。

具体实施方式

[0027] 实施例 1、免疫原、包被抗原的及抗体的制备

(1) 免疫原的合成

将乐果与牛血清蛋白 (BSA) 采用对氨基苯甲酸法进行偶联得到免疫原。具体包括以下步骤:

a、称取 14mg (100 μ mol) 对氨基苯甲酸 (ABA) 溶于 1.5mL 0.2M 盐酸中,然后称取 8.3mg (120 μ mol) 的亚硝酸钠 (NaNO_2) 溶于 0.24mL 的蒸馏水中,0—4℃ 搅拌,将亚硝酸钠 (NaNO_2) 溶液逐滴加入到对氨基苯甲酸溶液中,避光反应 1 小时,得溶液 A;

b、称取 34mg (100 μ mol) 乐果溶于 5mL 冰冷的硼砂缓冲 (0.05M) (pH8.5, 含 0.15M 的 NaCl) 中,0—4℃ 搅拌,将上述的 A 溶液 2mL 逐滴加入到该溶液中,避光反应 2 小时,得到桔黄色溶液;

c、把溶液加少量的硼酸晶体调 pH 至 7.4,然后加入 136mg (2 μ mol) cBSA (牛血清白蛋白),同时加入 160mg (834 μ mol) 水溶性碳二亚胺 (EDC),48mg (417 μ mol) N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS),室温搅拌 3 小时,得桔黄色溶液;

d、将反应液转移到半透膜中,在 0—4℃ 用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) (0.01M, pH7.4) 透析 3 天,其间每 4—6 小时换一次透析液;随后用高纯水透析 3 天,其间每 4—6 小时换一次透析液;透析完毕,用冷冻干燥机冻干,得桔黄色固体粉末即为免疫原 (乐果与牛血清蛋白的偶联物), -20℃ 保存,备用。

[0028] (2) 包被抗原的合成

将乐果与卵清蛋白 (OVA) 采用 1,4-丁二醚法进行偶联得到包被抗原。具体包括以下步骤:

a. 称取 66mg 卵清蛋白 (OVA) 溶于 5mL 50mM 碳酸盐 (pH10.7) 缓冲液中,然后向溶液中加入 28 μ L (147.9 μ mol) 的 1,4-丁二醚 (BDE),室温反应 24 小时,得溶液 A;

b. 称取 76mg (277.1 μ mol) 乐果溶于 1mL DMF (无水 N-N 二甲基甲酰胺) 中,再加 1mL 50mM 碳酸盐 (pH10.7) 缓冲液中,把溶液 A 通入氮气,随后将乐果溶液逐滴加入 A 溶液中,室温反应 24 小时,得淡黄色溶液;

c. 将反应液转移到半透膜中,在 0—4℃ 用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) (0.01M, pH7.4) 透析 3 天,其间每 4—6 小时换一次透析液;随后用高纯水透析 3 天,其间每 4—6 小时换一次透析液;透析完毕,用冷冻干燥机冻干,得白色固体粉末即为包被抗原 (乐果与卵清蛋白的偶联物), -20℃ 保存,备用。

[0029] (3) 乐果多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物,以乐果与分子量范围是 6.7KDa ~ 6.8KDa 的牛血清蛋白的偶联物为免疫原,首次免疫剂量为 500 μ g/mL,首免时将免疫原溶于入等体积的生理盐水和弗氏完全佐剂制成乳化剂,颈背部多点注射,以后免疫取剂量减半的免疫原溶于等体积的生理盐水和弗氏不完全佐剂混合乳化,首免与二免间隔 20 天,以后每隔两周免疫一次共免疫五次,最后一次不加佐剂。最后一次免疫 7 天以后心脏采血,离心得抗血清,得到乐果多克隆抗体。

[0030] 实施例 2、乐果 -ELISA 检测方法的建立

(1) 抗体与包被抗原浓度的优选 (方阵)

纵向用每种包被抗原按 40.0 μ g/mL、20.0 μ g/mL、10.0 μ g/mL、5.0 μ g/mL、2.5 μ g/mL、1.25 μ g/mL、0.625 μ g/mL、0.3125 μ g/mL 的系列稀释度包被酶标板,100 μ L/ 孔,0-4℃ 放置过夜,用洗涤液洗板三次,每次拍干;250 μ L/ 孔封闭溶液封闭,室温放置 2 小时,洗板三次,每次拍干;加入 100 μ L/ 孔一系列稀释的抗体 (1:100 至 1:1024000),室温放置 2.5 小时,洗板三次,每次拍干;加入 100 μ L/ 孔的 1:1000 的辣根过氧化物酶 - 羊抗兔 IgG 抗体,室温放置 1 小时,洗板三次,每次拍干;加入 100 μ L/ 孔的发光液,测定发光值。以发光值随包被抗原的浓度有明显梯度变化的包被抗原浓度和抗体稀释度为最佳浓度进行特异性测定。

[0031] (2) 抗体灵敏度的测定

根据上述对抗体及包被抗原浓度的优选实验,申请人选择并确定抗体浓度为 1:1000,包被抗原浓度为 10 μ g/mL 进行抗体的灵敏度的测定:

a、包被:用 0.05M pH9.6 的碳酸盐包被溶液将乐果的包被抗原配成 10 μ g/mL 的溶液,每个聚苯乙烯板的反应孔中加 100 μ L,4℃ 过夜;

次日,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗 3 次,300 μ L/ 孔,每次 5 分钟,拍干;(此步简称洗涤,下同);

b、封闭:用封闭溶液封闭上述已包被的酶标板,250 μ L/ 孔,室温孵 2-4 小时,然后洗涤;

c、加样:加稀释乐果抗体 (1:1000) 50 μ L/ 孔与不同浓度的乐果溶液 50 μ L/ 孔于上述已封闭的反应孔中,室温 2-4 小时,然后洗涤;

d、加酶标抗体:于各反应孔中,加入新鲜稀释辣根过氧化物酶 - 羊抗兔 IgG 的抗体 (1:1000) 100 μ L/ 孔,1.5 小时,洗涤;

e、发光:于各反应孔中加入临时配制的发光溶液 100 μ L/ 孔,立即用化学发光免疫分析仪检测;

f、检测结果以抑制率计算:

抑制率 (%) = B/B_0 %, B 是不同浓度的药物作为竞争者的发光值, B_0 是不加药的发光值,计算 50% 抑制率时药物的浓度即为该抗体的灵敏度。

[0032] 实施例 3、检测乐果的化学发光酶联免疫试剂盒

(1) 检测乐果的化学发光酶联免疫试剂盒的组成

a、包被有包被抗原 (乐果与载体蛋白的偶联物) 的固相载体 (酶标板);

b、乐果标准溶液:0mg/kg, 0.1mg/kg, 0.3mg/kg, 0.9mg/kg, 2.7mg/kg 和 8.1mg/kg;

c、酶标羊抗兔抗体溶液:酶标羊抗兔抗体为辣根过氧化物酶 - 羊抗兔 IgG 原液,装入,使用时用洗涤溶液配制成 1:1000 的工作浓度;

d、乐果抗体溶液：用人工免疫抗原免疫动物制备所得的多克隆抗体，将所得乐果抗体用洗涤溶液稀释成 1:1000 工作浓度；

e、发光溶液：使用 pH8.8 的 0.0001M 对甲苯酚的三（羟甲基）氨基甲烷溶液配制成 0.01M 的鲁米诺溶液，再与 H_2O_2 按照 3:10000 的体积比混合；

f、洗涤溶液：含有体积分数 0.05% 吐温-20 的 pH7.5、0.1mol/L 磷酸盐缓冲液；

g、包被溶液：1.59g 碳酸钠和 2.53g 碳酸氢钠溶于 1L 水中，调节 pH9.5；

h、封闭溶液配制：10g 卵清蛋白（OVA）溶于 1L 洗涤溶液中，再加入重量比为 0.05% 的 NaN_3 。

[0033] (2) 酶标板的制备

用包被液将包被抗原稀释成 10 μ g/mL，每孔加入 100 μ L，4℃ 过夜，倾去包被液，每孔加入 250 μ L 洗涤液洗涤 3 次，拍干，然后每孔加入封闭液 250 μ L，37℃ 孵育 1h，倾去孔内液体，洗涤液洗涤 3 次，拍干，用锡箔纸真空密封保存。

实施例

[0034] 4、检测乐果的化学发光酶联免疫试剂盒的应用

(1) 试剂的配制

a. 样品稀释液：将试剂盒中提供的浓缩磷酸盐缓冲溶液用蒸馏水稀释 10 倍后使用；

b. 洗涤溶液：将试剂盒中提供的浓缩洗涤液用蒸馏水稀释 10 倍后使用；

c. 发光溶液：0.01M 鲁米诺 +0.001M 对甲苯酚的三（羟甲基）氨基甲烷溶液（pH8.8）+3/10000（体积比） H_2O_2 。

[0035] (2) 样品前处理

a、配制乙腈-水溶液（体积比为 1:1）；

b、研磨代表性样品（使 50% 的样品可以通过一个 20 目的滤网）；

c、称量 20 g 研磨过滤后的样品加入 40 mL 乙腈-水溶液，样品稀释比为 1:2(w/v)；

d、在密封的容器里混合，震荡涡旋 1 min；

e、室温离心 4000r/min 以上，10min；取 1ml 上清液到离心管中，50~60℃ 水浴氮气吹干；

f、加入 1 mL 稀释后的样品稀释液充分振荡混合 30 s，混匀待测。

[0036] (3) 检测步骤

a、加样：向酶标板微孔中加入乐果系列标准浓度溶液或样品溶 50 μ L，然后加入乐果抗体溶液 50 μ L，室温（25℃）恒温孵育 2.5h；

b、洗涤：倾出孔中液体，每孔加入洗涤溶液 250 μ L，洗涤 3 次，拍干；

c、加酶标羊抗兔抗体溶液：每孔加入酶标羊抗兔抗体溶液 100 μ L，室温恒温孵育 1h；

d、洗涤：倾出孔中液体，每孔加入洗涤溶液 250 μ L，洗涤 3 次，拍干；

e、加发光溶液：每孔加入发光溶液 100 μ L；

f、检测：用化学发光免疫分析仪测定每孔的发光强度。

[0037] (4) 结果判断

所获得的标准品和样品发光值的平均值除以第一个标准（0 标准）的发光值再乘以 100，以抑制率为纵坐标，乐果浓度的对数为横坐标作标准曲线，每一个样品的浓度可以从

标准曲线上读出。

[0038] 抑制率(%) = 标准品发光值(或样品) × 100% / 0 标准品发光值。

[0039] 实施例 5 试剂盒精密度和准确度试验

取 0.1mg/kg, 0.3mg/kg, 0.9mg/kg, 2.7mg/kg 和 8.1mg/kg 的乐果标样, 添加到农作物样品中, 来检测乐果回收率。每个浓度的批间变异系数都以不同的 5 天的 5 个重复数据进行计算, 批内变异系数以同一天的 5 次重复数据计算。

[0040] 根据制定的标准曲线的线性方程进行回收率的定量计算。

[0041] 从上述测定结果看, 变异系数低于 25.4%, 回收率 82-118% 之间。表明本试剂盒有很好的重复性和准确度。

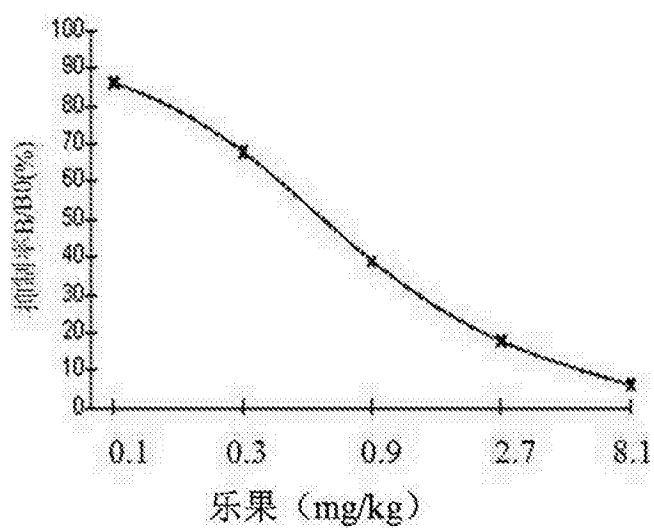


图 1

专利名称(译)	一种检测乐果的化学发光酶联免疫分析法		
公开(公告)号	CN105572342A	公开(公告)日	2016-05-11
申请号	CN201410537497.0	申请日	2014-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	杜道林 洪霞 刘静		
发明人	杜道林 洪霞 刘静		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种乐果的化学发光酶联免疫检测试剂盒，包括盒体，设在盒体内的酶标板和设在盒体内的试剂；其特征在于，所述酶标板的各孔包被有包被抗原即乐果类母核与载体蛋白的偶联物；所述试剂包括：乐果类单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体、乐果类系列标准溶液、浓缩磷酸盐缓冲液、浓缩洗涤液、化学发光液；本发明的化学发光酶联免疫检测试剂盒具有高灵敏度、简便快速、准确度高、检测药物种类多的特点，与传统的比色ELISA法比较，操作时间大幅度减少；该方法可直接用于检测农作物（大豆、水稻、小麦、大麦等）中的乐果含量。

