



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510041980.0

[43] 公开日 2005 年 10 月 26 日

[11] 公开号 CN 1687781A

[22] 申请日 2005.4.21

[21] 申请号 200510041980.0

[71] 申请人 西安绿盾生物科技发展有限公司

地址 710075 陕西省西安市西安市高新区高新六路 38 号西安信息技术孵化园 A 座 6F22 号

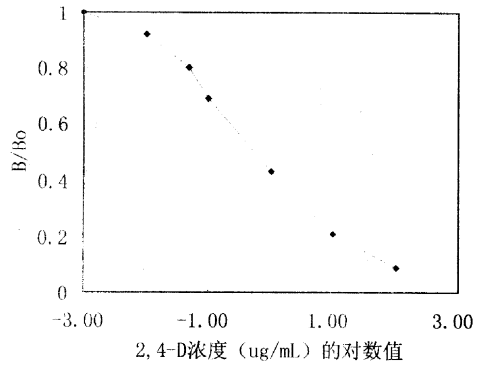
[72] 发明人 许艇 潘峰 李季 井德明

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称 一种 2,4-D 残留的酶联免疫吸附分析试剂盒

### [57] 摘要

本发明公布了一种 2,4-D 残留的酶联免疫吸附分析试剂盒,属于酶免疫分析技术领域。本发明克服了 2,4-D 理化分析方法操作复杂、检测成本高及速度慢等缺点,能准确快速地检测水和土壤等样品中 2,4-D 残留。检测过程中,酶标板孔壁上吸附的包被抗原和待测 2,4-D 相互竞争与溶液中的抗体反应,竞争结果通过酶催化反应显色显示出来。通过检测已知浓度的 2,4-D 并绘制标准曲线,可以推算出待测 2,4-D 的浓度。试剂盒的保存期超过 6 个月。



1. 一种 2,4-D 残留的酶联免疫吸附分析试剂盒, 其特征在于由箱体、可拆卸 96 孔酶标板、海绵支架和支架内包含有浓缩洗涤液(PBST)、不同浓度的 2,4-D 标准液、抗 2,4-D 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体、A 液、B 液和反应终止液的试剂瓶组成。

2. 根据权利要求 1 所述的一种 2,4-D 残留的酶联免疫吸附分析试剂盒, 其特征在于所述的海绵支架上有装试剂瓶的孔槽。

3. 根据权利要求 1 所述的一种 2,4-D 残留的酶联免疫吸附分析试剂盒, 其特征在于所述的可拆卸 96 孔酶标板用铝箔袋真空包装, 酶标板的板条可拆卸下来, 每个孔内均吸附有相同量的包被抗原。

4. 根据权利要求 3 所述的包被抗原, 其特征在于为 2,4-D 与卵清蛋白(OVA)的偶联复合物。

5. 根据权利要求 1 所述的一种 2,4-D 残留的酶联免疫吸附分析试剂盒, 其特征在于所述的抗 2,4-D 多克隆抗体制备方法如下: 将 2,4-D 与牛血清白蛋白(BSA)偶联的复合物作为免疫原, 免疫新西兰大耳白兔, 获得 2,4-D 的多克隆抗体。

6. 根据权利要求 1 所述的一种 2,4-D 残留的酶联免疫吸附分析试剂盒, 其特征在于所述的不同浓度的 2,4-D 标准液用甲醇和蒸馏水配制, 溶液中甲醇的含量小于 1%。浓度分别为  $0 \mu\text{g/mL}$ ,  $0.01 \mu\text{g/mL}$ ,  $0.05 \mu\text{g/mL}$ ,  $0.1 \mu\text{g/mL}$ ,  $1 \mu\text{g/mL}$ ,  $10 \mu\text{g/mL}$ ,  $100 \mu\text{g/mL}$ 。

7. 根据权利要求 1 所述的一种 2,4-D 残留的酶联免疫吸附分析试剂盒, 其特征在于所述的浓缩洗涤液(PBST)内含有氯化钠 7~9g、磷酸二氢钾 0.1~0.3g、磷酸氢二钠 2~4g、氯化钾 3~6g、吐温-20 1mL、双蒸水 50 mL。

8. 根据权利要求 1 所述的一种 2,4-D 残留的酶联免疫吸附分析试剂盒, 其特征在于所述的 A 液: 过氧化尿 10mg, 103mg 柠檬酸, 358mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 吐温-20  $1 \mu\text{L}$ , 蒸馏水 10 mL, pH5; B 液: 四甲基联苯胺(TMB)4mg(用  $500 \mu\text{L}$  二甲亚砜溶解), 103mg 柠檬酸, 蒸馏水 9.5 mL, pH2.4。

---

9. 根据权利要求 1 所述的一种 2,4-D 残留的酶联免疫吸附分析试剂盒, 其特征在于所述的反应终止液为 2mol/L 的硫酸液。

## 一种 2, 4-D 残留的酶联免疫吸附分析试剂盒

### 一、技术领域

本发明涉及一种 2, 4-D 残留的酶联免疫吸附分析 (ELISA) 试剂盒, 主要用于大批量水和土壤等样品中 2, 4-D 残留的快速测定。属于酶免疫分析技术领域。

### 二、背景技术

2, 4-D 是一种有机氯除草剂, 过去主要用于禾谷类作物, 特别是麦田和玉米中防除一年生及多年生莎草和双子叶杂草。2, 4-D 在环境中的残留期长, 据报道, 2, 4-D 是一种潜在的致癌物, 并且由于它的广泛使用, 已造成了我国地下水和饮用水的污染。

除草剂 2, 4-D 残留常规的分析主要是应用气相色谱 (GC) 和高效液相色谱 (HPLC) 等仪器在实验室进行。应用这些理化分析技术对环境、生物、食品等样品中痕量 2, 4-D 残留进行分析, 不仅仪器化程度要求较高, 并且需要经过繁复的分离、提取、净化、衍生等前处理过程, 分析速度慢、成本高, 前处理过程需要使用大量的有机溶剂, 又造成了二次污染。随着待检样品、特别是要求现场快速检测样品量的迅速增加, 传统的农药残留分析手段难以适应要求, 因此, 迫切需要开发和应用高效率农药残留快速分析技术。

酶联免疫吸附分析方法特异性强、灵敏度高而且简便快速, 可以弥补色谱分析方法的缺陷, 本发明对解决大批量样品的 2, 4-D 残留现场监控技术具有重要的现实意义。

### 三、发明内容

为了解决目前农药残留仪器分析方法成本高、操作复杂、特异性差、灵敏度低和检测结果不稳定等缺点, 本发明提供了一种具有高特异性、高灵敏度、高准确度、高精度、操作方法简单, 并能用于大批量样品快速检测的 2, 4-D 残留的酶联免疫吸附分析试剂盒。

2, 4-D 残留的酶联免疫吸附分析试剂盒包括盒体、设在盒体内的 96 孔酶标板、海绵支架和支架内包含有浓缩洗涤液 (PBST)、不同浓度的 2, 4-D 标准液、

抗 2,4-D 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体、A 液、B 液和反应终止液。

本发明解决其技术问题所采用的技术方案是：首先利用活性酯法将 2,4-D 与牛血清白蛋白偶联后制备人工免疫原，用该免疫原免疫新西兰大耳白兔制备出 2,4-D 多克隆抗体。再用混合酸酐法将 2,4-D 与卵清蛋白偶联，它们的复合物作为包被抗原被固定于酶标板孔壁上。预先将待测 2,4-D 样品和多克隆抗体混合反应 30 分钟，再将反应后的抗原抗体加入到酶标板孔中，固相包被抗原和待测 2,4-D 相互竞争与抗体反应，由于每个孔中的固相抗原含量和加入的抗体含量均一致，所以当待测的 2,4-D 浓度高时，被结合在固相抗原上的抗体（一抗）量就少，加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体（二抗）后，二抗与一抗的结合量少，最后加入底物液（A 液）和显色液（B 液），显色反应浅（OD 值低），表明抑制率高；反之，当待测 2,4-D 浓度低时，则所测的 OD 值高，抑制率低。用已知的 2,4-D 浓度检测并绘制标准曲线，可以推算出待测 2,4-D 的浓度。

本发明的优点是能准确灵敏地检测水和土壤中 2,4-D 残留，样品的前处理过程简单，耗时少，能同时检测大量的样品，样品检测成本远低于传统的仪器检测方法。试剂盒的保存期至少 6 个月。

#### 四、附图说明

附图为 2,4-D 的标准抑制曲线，曲线的回归方程为  $y = -0.2015x + 0.4676$  ( $R^2 = 0.9757$ ),  $IO_{50} = 0.69 \mu\text{g/mL}$ ,  $IC_{20} = 0.02 \mu\text{g/mL}$ 。

#### 五、具体实施方式

试剂盒操作及结果计算：待测样品经前处理后，用 PBST 定容备用。拆开真空包装袋并取出酶标板，在室温下平衡 5 分钟备用。将相同浓度的抗体分别与不同浓度（0  $\mu\text{g/mL}$ ，0.01  $\mu\text{g/mL}$ ，0.05  $\mu\text{g/mL}$ ，0.1  $\mu\text{g/mL}$ ，1  $\mu\text{g/mL}$ ，10  $\mu\text{g/mL}$ ，100  $\mu\text{g/mL}$ ）的 2,4-D 标准液或待测 2,4-D 液混合，37°C 孵育 30 分钟；然后将 100  $\mu\text{L}$  此反应混合溶液移入酶标板中，37°C 孵育 30 分钟；倒出孔中的液体，用稀释好的 PBST 洗 2~6 次，将酶标板倒置在吸水纸上拍干；加入按 1:1000 稀释好的酶标羊抗兔二抗 100  $\mu\text{L}$ ，37°C 孵育 30 分钟；倒出孔中的液体，用 PBST 洗板 2~6 次，拍干；取 A 液和 B 液等体积混匀，每孔加 100  $\mu\text{L}$ ，在暗处显色 10~

15 分钟, 每孔加入 50  $\mu$ l 的终止液终止反应, 酶标仪上测定各孔在波长为 450nm 处的 OD 值。

将含 0  $\mu$ g/ml 标准品孔的 OD 值减去含最大浓度标准品孔的 OD 值定为  $B_0$ , 其余孔经同样方法校正后的 OD 值定为 B; 以  $B/B_0$  值为纵坐标, 相应标准品浓度的对数值 ( $\log C$ ) 为横坐标, 绘制 2,4-D 标准抑制曲线。根据曲线的回归方程可以推算出对应样品的浓度, 也可以推算出  $IC_{50}$  ( $B/B_0=50\%$ ) 及最小检测限  $IC_{20}$  ( $B/B_0=80\%$ ), 其中  $IC_{50}$  为抑制 50% 抗原抗体反应所需 2,4-D 浓度,  $IC_{20}$  为抑制 20% 抗原抗体反应所需 2,4-D 浓度。

## 实施例 1

2,4-D 与载体蛋白偶联:

### (1) 活性酯法偶联 2,4-D 与牛血清白蛋白 (BSA)

称 42mg (0.19mmol) 2,4-D 和 22mg (0.19mmol) N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶于 2mL 无水二氧杂环己烷, 缓慢滴加 N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC) 溶液 (39mg 溶于 0.5mL 二氧杂环己烷), 室温搅拌反应 18 小时, 离心, 取上清液。将 30mg BSA 溶于 2mL 0.1mol/L pH9.1 的硼酸缓冲溶液中, 逐滴加入 200  $\mu$ L 上清液, 室温搅拌反应 4 小时。反应液装入透析袋对 0.01 mol/L pH7.4 的 PB 透析。每 6 小时换液一次, 总共换液 5~6 次。透析后离心, 上清液冷冻干燥, 4 $^{\circ}$ C 保存。

### (2) 混合酸酐法偶联 2,4-D 与卵清白蛋白 (OVA)

称 30 mg 2,4-D (约 18  $\mu$ mol) 溶于 200  $\mu$ L 无水二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 然后按顺序加入 4.27  $\mu$ L (约 18  $\mu$ mol) 三正丁胺、2.34  $\mu$ L (约 18  $\mu$ mol) 氯甲酸异丁酯, 室温搅拌反应 1 小时。称 30mg OVA 溶于 2mL 0.05mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲溶液中, 逐滴加入 100  $\mu$ L 上一步反应液, 室温搅拌反应 3 小时, 然后将反应液透析、离心、冷冻干燥, 4 $^{\circ}$ C 保存。

## 实施例 2

2,4-D 多克隆抗体制备:

将 2,4-D 与 BSA 的偶联物作免疫原, 称 2mg 免疫原溶于 1mL 无菌生理盐水中, 与 1mL 完全弗氏佐剂混合, 充分乳化后注射新西兰大耳白兔大腿, 以后每

隔两周加强免疫一次，换用不完全弗氏佐剂与免疫原混合，免疫部位为颈背部皮下，从第三次免疫开始，每次免疫后一周从兔耳静脉采血检测血清效价。总共免疫5次，最后一次免疫后一周从兔颈动脉采全血，先用35%的饱和硫酸铵盐析法粗提兔抗血清，再用DE-52阴离子交换层析法进一步纯化，获得较纯的2,4-D多克隆抗体。

### 实施例3

#### 保存期实验：

将试剂盒放置于4℃保存，分别取0、10、20、30、60、90、120、150和180d的试剂盒，以最佳抗体抗原工作浓度为测定浓度，进行标准样品检测以测定其检测效果。保存期测定结果如下表：

表1 试剂盒保存实验结果

时间 (d)	0	10	20	30	60	90	120	150	180
B <sub>0</sub> (450nm)	0.94	1.02	1.03	0.95	0.92	1.04	0.94	0.98	0.91
IC <sub>50</sub> (μg/mL)	0.68	0.71	0.72	0.68	0.70	0.67	0.70	0.69	0.67

从以上结果可以看出，IC<sub>50</sub>变化不大，试剂盒在4℃下至少可保存6个月以上。

### 实施例4

#### 试剂盒特异性实验

选择2,4-D的结构类似物作为待测物，测得各物质的抑制中浓度(IC<sub>50</sub>)，再用下式计算抗体对这些物质的交叉反应性；交叉反应率愈小，则抗体对2,4-D的特异性愈强，反之则抗体的特异性差。

$$\text{交叉反应 (CR\%)} = \text{IC}_{50}(2,4\text{-D}) / \text{IC}_{50}(\text{供试物}) \times 100\%.$$

实验测定结果见表2，采用间接ELISA法，多克隆抗体与2甲4氯的交叉反应是8.5%。与2,4-滴丁酯、2,4-二氯苯甲醛和2,4-二氯苯甲酸的交叉反应均小于1%。2甲4氯也是一种除草剂，它和2,4-D一般不会同时存在于样品中，所以不会影响该试剂盒对2,4-D的检测。

表 2 交叉反应

化合物名称	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	交叉反应 (%)
2, 4-D	0.69	100
2 甲 4 氯	8.12	8.5
2, 4-滴丁酯	>100	<1
2, 4-二氯苯甲 醛	>100	<1
2, 4-二氯苯甲 酸	>100	<1

### 实施例 5

#### 添加回收实验

取适量 2, 4-D 标样添加到样品中, 设置 0.5mg/kg, 1mg/kg 和 5mg/kg 三个浓度, 每个浓度设 6 个重复, 进行测定。

#### ELISA 检测样品的前处理:

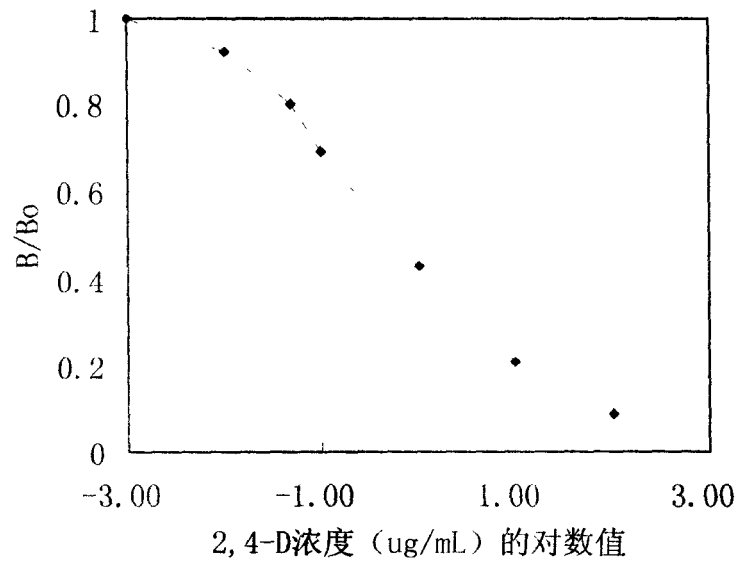
水样: 加入 EDTA 过滤后即可取样进行 ELISA 分析。

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

试剂盒的检测结果见表 3, 水样回收率为 82~106%, 变异系数 5.6~11.2%, 土壤样品回收率为 94~104%, 变异系数 6.6~7.8%。试剂盒的回收率在允许范围内, 符合农药残留分析对精确度的要求。

表 3 试剂盒添加回收测定结果

样品	添加 2, 4-D 浓度 (ppm)	ELISA 测定 平均值 (ppm) n=6	回收率 (%)	变异系数 (%)
水样	0.5	0.41±0.046	82	11.2
	1	0.93±0.088	93	9.5
	5	5.28±0.296	106	5.6
土壤	0.5	0.52±0.040	104	7.8
	1	0.94±0.062	94	6.6
	5	4.82±0.348	96.4	7.2



专利名称(译)	一种2, 4 - D残留的酶联免疫吸附分析试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN1687781A</a>	公开(公告)日	2005-10-26
申请号	CN200510041980.0	申请日	2005-04-21
[标]发明人	许艇 潘峰 李季 井德明		
发明人	许艇 潘峰 李季 井德明		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公布了一种2, 4 - D残留的酶联免疫吸附分析试剂盒, 属于酶免疫分析技术领域。本发明克服了2, 4 - D理化分析方法操作复杂、检测成本高及速度慢等缺点, 能准确快速地检测水和土壤等样品中2, 4 - D残留。检测过程中, 酶标板孔壁上吸附的包被抗原和待测2, 4 - D相互竞争与溶液中的抗体反应, 竞争结果通过酶催化反应显色显示出来。通过检测已知浓度的2, 4 - D并绘制标准曲线, 可以推算出待测2, 4 - D的浓度。试剂盒的保存期超过6个月。

