



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101368946 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 30

(21) 申请号 200810029088. 4

(22) 申请日 2008. 06. 27

(73) 专利权人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483 号

(72) 发明人 雷红涛 吴青 薛钢 沈玉栋
孙远明 王弘 徐小艳 李美英
肖治理 柳春红

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 林丽明 任重

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

(56) 对比文件

RU 2326384 C1, 2008. 06. 10, 全文.

US 5147786 A, 1992. 09. 15, 全文.

CN 2847296 Y, 2006. 12. 13, 全文.

薛钢. 丁草胺荧光偏振免疫分析——示踪物
的合成与鉴定. 《中国农业科学》. 2008, 第 41 卷
(第 11 期), 3651-3655.

Tessier DM, Clark JM. Hapten design
in the development of competitive
enzyme-linked immunosorbent assays for
genotoxic metabolites of alachor. 《J Agric
Food Chem》. 1999, 第 47 卷 (第 9 期), 3925-33.

JULIA N. YAKOVLEVA 等. PRODUCTION OF
ANTIBODIES AND DEVELOPMENT OF SPECIFIC
POLARIZATION FLUOROIMMUNOASSAY FOR
ACETOCHLOR. 《Intern. J. Environ. Anal.
Chem. 》. 2002, 第 82 卷 (第 11 - 12 期), 851 -
863.

雷红涛等. 丁草胺人工抗原及抗体制备研
究. 《食品科学》. 2007, 第 28 卷 (第 10 期), 67-71.

审查员 尹军团

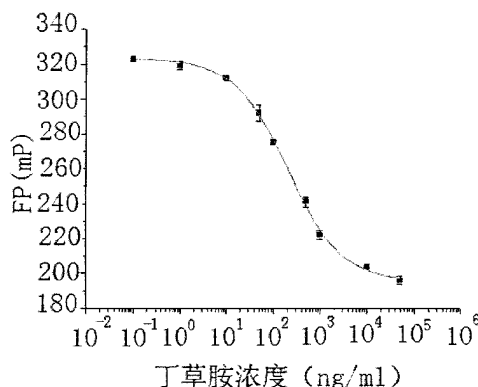
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

丁草胺极化荧光免疫检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种丁草胺极化荧光免疫检测
方法, 包括将待分析样品和荧光标记半抗原混合、
加入丁草胺抗体、直接测量反应体系的极化荧光
信号、根据丁草胺标准样品建立的标准曲线计算
待分析样品中丁草胺浓度等步骤。本发明所建立
的方法, 室温即可操作, 整个反应时间很短, 可同
时检测多个样品, 一步完成, 不需洗涤, 配备机械
手后可实现加样、读数自动化, 是一种高通量、自
动化免疫检测方法。

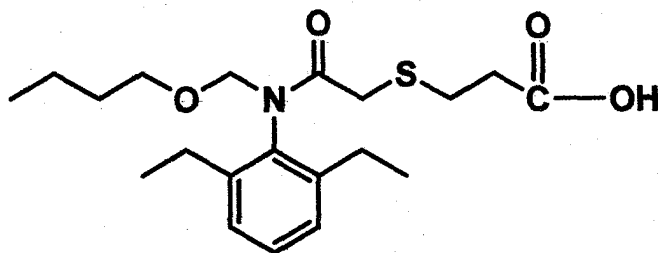


1. 一种丁草胺极化荧光免疫检测方法,其特征在于包括以下步骤:

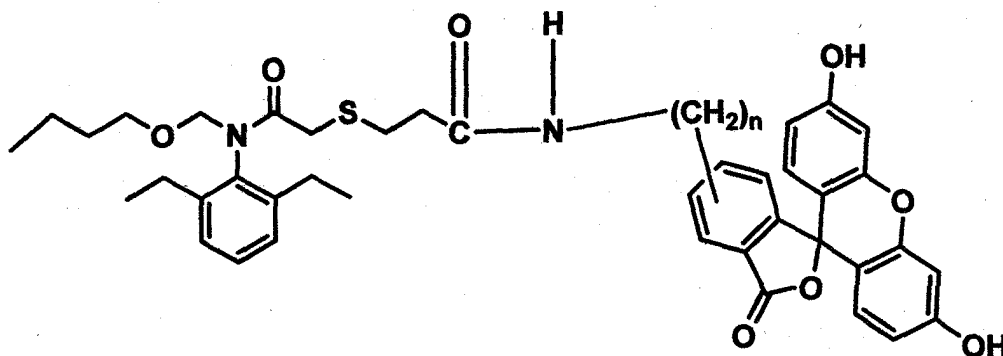
- (1) 将待分析样品和荧光标记半抗原混合;
- (2) 往步骤(1)混合物中加入丁草胺抗体;
- (3) 测量反应体系的极化荧光信号;
- (4) 根据丁草胺标准样品建立的标准曲线计算待分析样品中丁草胺浓度;

其中,步骤(1)所述的荧光标记半抗原是氨基荧光素或者异硫氰酸荧光素与丁草胺半抗原的偶联物;

所述的丁草胺半抗原结构如下:

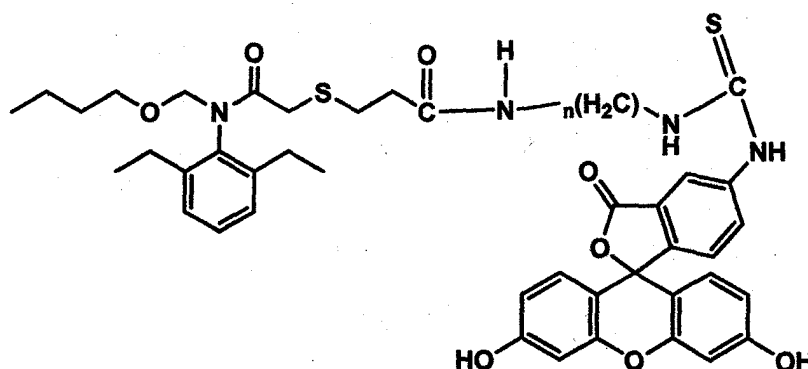


所述的氨基荧光素与丁草胺半抗原的偶联物氨基荧光素标记半抗原的结构如下:



其中, $n = 6$;

所述的异硫氰酸荧光素与丁草胺半抗原的偶联物异硫氰酸荧光素标记半抗原的结构如下:



其中, $n = 6$ 。

2. 根据权利要求1所述丁草胺极化荧光免疫检测方法,其特征在于步骤(1)所述的待分析样品包括水样、土壤提取液、农产品或食品提取液。

3. 根据权利要求1所述丁草胺极化荧光免疫检测方法,其特征在于步骤(2)所述的丁

草胺抗体包括抗丁草胺的多克隆抗体、单克隆抗体、重组抗体或抗体片段。

丁草胺极化荧光免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物免疫检测分析技术领域,具体涉及一种除草剂的快速均相荧光免疫检测方法。

背景技术

[0002] 近年来,因不合理使用农药而引起的群体性中毒和农产品农残超标事件屡有发生,农药残留标准也成为发达国家贸易技术壁垒的主要内容。农药残留问题在严重危害人民群众身体健康的同时,也严重影响了我国农产品的国际竞争力。

[0003] 丁草胺是一种高效的芽前选择性氯乙酰苯胺类除草剂,在我国主要被用于去除水稻田中的杂草,是生产和使用量最大的除草剂品种之一,但丁草胺在环境中稳定性强、残留期长,对环境、生物表露出一定危害性,逐渐引起人们关注。目前,用于检测除草剂丁草胺的主要方法有气相色谱法、液相色谱法和色谱联用等理化仪器方法,这些方法需要昂贵的设备和熟练操作的技术人员和复杂的样品前处理,并且1次只能检测1个样品,不适合大量样品的筛选检测。因此,开发快速、低成本、操作简单的分析方法就具有重要的现实意义。

[0004] 免疫分析技术是一种以抗原-抗体间反应为基础的生物化学分析方法,利用抗原抗体间的高特异性和高亲和性,就可以达到从复杂组份中特异性识别待测物及满足检测高灵敏度的要求。目前,非均相的酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)以其高效、低成本和高灵敏度的优势,应用最广。雷红涛等公开了丁草胺直接竞争ELISA检测方法(除草剂丁草胺直接竞争ELISA检测方法研究,农业环境科学学报,2006,25(4):1018~1023),但是该方法每反应一步,就要分离一次反应结合物和未反应的游离试剂,而且需多步反应、洗涤,比较繁琐;万积成的专利“快速检测甲草胺、乙草胺、丁草胺残留的胶体金试纸”(ZL 200520142627.7)公开了另一种非均相的丁草胺胶体金检测方法,但该法只能定性测定,不能定量,且1条试纸只能测1个样品,检测通量很低。因此,很有必要发展一种能够一步完成的高通量均相检测法。

[0005] 极化荧光免疫分析作为一种均相免疫检测方法,反应只需一步,通常时间仅需几分钟到十几分钟,无需分离洗涤操作,采用微孔板1次可以检测几十甚至几百个样品,便于高通量、自动化免疫检测,应用前景非常良好。目前,国内尚未见农药极化荧光免疫分析的相关报道。

发明内容

[0006] 本发明旨在克服现有技术中非均相免疫分析方法的缺点,建立一种新型均相免疫分析丁草胺的方法,即建立一种用于除草剂丁草胺快速检测的极化荧光免疫分析方法。

[0007] 本发明的目的通过以下技术方案来予以实现:

[0008] 提供一种丁草胺极化荧光免疫检测方法,包括以下步骤:

[0009] (1) 将待分析样品和荧光标记半抗原混合;

[0010] (2) 往步骤(1)混合物中加入丁草胺抗体;

[0011] (3) 测量反应体系的极化荧光信号；

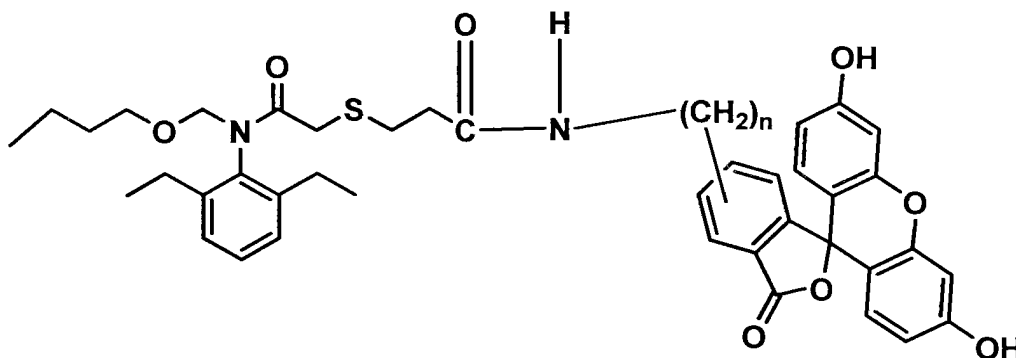
[0012] (4) 根据丁草胺标准样品建立的标准曲线计算待分析样品中丁草胺浓度。

[0013] 将丁草胺待检样品和荧光标记半抗原混合，随后加入丁草胺抗体，经短暂时间反应，直接测量反应体系的极化荧光值。极化荧光信号随分析物浓度的变化而变化，用已知浓度的丁草胺标准样品建立的标准曲线可计算分析物中丁草胺浓度。

[0014] 步骤(1)所述的荧光标记半抗原是氨基荧光素或者异硫氰酸荧光素与丁草胺半抗原的偶联物，荧光标记半抗原包括氨基荧光素标记半抗原、异硫氰酸荧光素标记半抗原两类结构：

[0015] 氨基荧光素标记半抗原的结构如下：

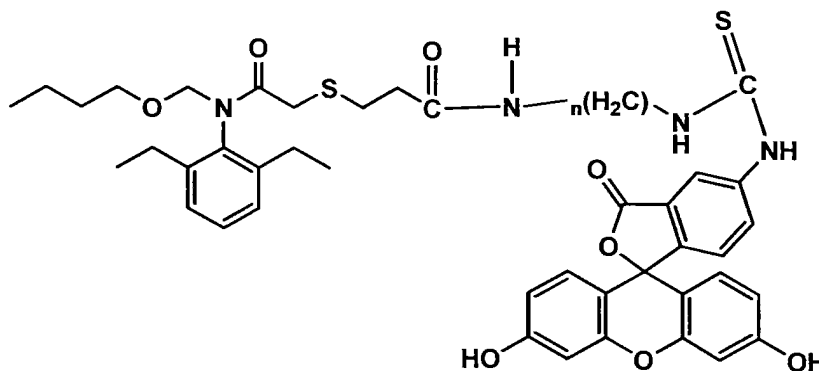
[0016]



[0017] 其中， $n = 0 \sim 6$ 。

[0018] 异硫氰酸荧光素标记半抗原的结构如下：

[0019]

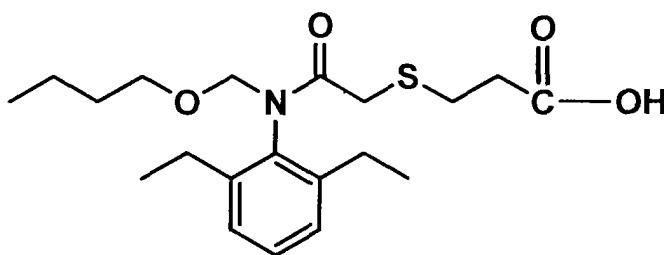


[0020] 其中， $n = 2 \sim 8$ 。

[0021] 本检测方法中，优选的荧光标记半抗原为异硫氰酸荧光素标记半抗原 ($n = 2 \sim 8$)，最优化的为异硫氰酸荧光素标记半抗原 ($n = 6$)；

[0022] 所述的丁草胺半抗原结构如下：

[0023]



[0024] 本发明所述的待分析样品包括水样、土壤提取液、农产品或食品提取液。

[0025] 本发明所述的丁草胺抗体包括抗丁草胺的多克隆抗体、单克隆抗体、重组抗体或抗体片段。

[0026] 本发明的有益效果是：

[0027] (1) 本发明所建立的方法，室温即可操作，整个反应时间很短；

[0028] (2) 本发明方法可同时检测多个样品，例如 96 孔微孔板上可同时检测 96 个样品，一步完成，不需洗涤；

[0029] (3) 本发明方法配备机械手后可实现加样、读数自动化，是一种高通量、自动化免疫检测方法。

附图说明

[0030] 图 1 为利用己二胺化异硫氰酸荧光素 ($n = 6$) 标记丁草胺半抗原建立的丁草胺极化荧光免疫检测的标准曲线

[0031] 图 2 为用缓冲液和 5 种水样配制样品作的检测曲线

具体实施方式

[0032] 为进一步说明本发明，以下从荧光标记半抗原制备、活性鉴定、标准曲线建立，基质效应考察、添加回收率考察等方面的实施例来予以说明。

[0033] 实施例 1 荧光标记半抗原制备方法

[0034] 以下以己二胺化异硫氰酸荧光素（简称 HDF， $n = 6$ ）标记半抗原制备方法为例具体说明，其他异硫氰酸荧光素标记半抗原以及氨基荧光素标记半抗原方法与此类似。

[0035] 将 15.2mg 丁草胺半抗原 (BMPA)，16.0mg N,N'-二环己基碳二亚胺和 9.7mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中，搅拌反应过夜，在所得上清中加入 4.5mg HDF，室温下避光搅拌反应过夜，产物用薄层层析硅胶板分离用三氯甲烷 + 甲醇 (4 : 04, v/v) 作展开剂。将不同 Rf 的产物用甲醇提取，所得提取物（命名为 BMPA-HDF）用于活性鉴定。

[0036] 实施例 2 荧光标记半抗原活性鉴定

[0037] 在 PE Victor-3 仪器上测定荧光标记半抗原与 100 倍稀释抗血清结合后的极化荧光值，通过比较荧光标记半抗原与结合特异性抗体后 mp 值的变化来鉴定荧光标记半抗原活性。如表 1 所示，Rf 值不同的产物与抗体反应后的极化值变化不一样，Rf = 0.9 的产物反应前后信号差异最大，能与抗体特异结合，说明该产物具有活性，因此 Rf = 0.9 的产物作为随后研究的荧光标记半抗原 (MBPA-HDF)。

[0038] 表 1

[0039]

	游离标记物 mp	与血清结合后最大 mp
$R_f=0.7$	125	144
$R_f=0.8$	110	119
$R_f=0.9$	142	363

[0040] 实施例 3 标准曲线绘制

[0041] 硼酸盐缓冲液 (BB 溶液) 作为稀释液用于所有样品稀释。将 100 μ L 荧光标记半抗原与 20 μ L 不同浓度的丁草胺标准品先后加入荧光微孔板孔中, 再加入 100 μ L 400 倍稀释的丁草胺抗体, 15min 后, FP 值通过 Wallac VICTOR³ 1420 多标记分析仪进行测定。以 mP 值为纵坐标, 标准品浓度对数值为横坐标, 应用 originPro7.5 软件四参数对数方程进行曲线拟合, 建立竞争抑制曲线, 见附图 1。附图 1 为利用己二胺化异硫氰酸荧光素 (n = 6) 标记丁草胺半抗原建立的丁草胺极化荧光免疫检测的标准曲线, 其与本发明的实施方案一致, 可用于各种待分析样品的检测。未知浓度的待分析样品中丁草胺的浓度即可根据标准曲线计算得出。

[0042] 四参数对数方程为:

$$[0043] \quad Y = \frac{A-D}{[1+(x/C)^B]+D} \quad (1)$$

[0044] 其中, A 和 D 分别代表药物浓度最小和最大时的 FP, C 为 midpoint 浓度, 当药物浓度等于 C 时的荧光偏振值为 (A+D)/2, 正处于曲线的拐点处, 浓度为 IC₅₀, B 表示曲线的陡峭程度, 称斜率因子; 以 IC₁₀ 为检测限, 以 IC₂₀ ~ IC₈₀ 为检测范围; A-D 命名为 δ mP。

[0045] 实施例 4 样品前处理

[0046] 对于水样, 如果混浊, 用普通滤纸过滤或者离心后使用, 澄清水样无需处理; 对于土壤、大米等样品, 采用乙腈进行提取, 然后离心, 旋转蒸发脱去溶剂, 用含甲醇 10% 的硼酸盐缓冲液复溶, 然后再测定。

[0047] 实施例 5 评估基质效应

[0048] 分别用缓冲液和五种实际水样 (泉水、蒸馏水、纯净水、自来水和池塘水) 来配制样品作检测曲线, 观察基质对标准曲线的影响, 见附图 2, 附图 2 为用缓冲液和 5 种水样配制样品作的检测曲线, 水样包括泉水、蒸馏水、纯净水、自来水和池塘水, 其中曲线 1 为自来水, 曲线 2 为纯净水, 曲线 3 为池塘水, 曲线 4 为泉水, 曲线 5 为缓冲液, 曲线 6 为蒸馏水。与本发明的实施方案一致, 表明所建立的方法没有明显基质干扰, 从图中可以看到六条曲线基本吻合, 所以在这 5 种水样中不存在基质干扰。

[0049] 实施例 6 实际水样检测

[0050] 通过在不同的实际水样中添加标准品, 配置成浓度为 50、100、200、500 和 1000ng/mL 的添加样。

[0051] 将 100 μ L 荧光标记半抗原与 20 μ L 不同浓度的丁草胺添加样先后加入 96 孔荧光微孔板孔中, 再加入 100 μ L 400 倍稀释的丁草胺抗体, 每个样品平行做 6 个, 温育 5min 后

测读极化荧光值 (mp), 根据前边绘制的标准曲线计算实测浓度, 计算其回收率和变异系数, 见表 2, 回收率用来衡量方法准确度, 变异系数用来衡量方法稳定性。

[0052] 表 2

[0053]

水样	添加量 (ng/mL)	实际测得量 (ng/mL)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	CV (%)	CV mean (%)
自来水	50	37.87	75.7	89.5	28.38	16.85
	100	95.48	95.5			
	200	169.45	84.7			
	500	395.23	79			
	1000	1126.43	112.6			
泉水	50	52.28	104.5	105.5	8.5	16.43
	100	115.80	115.8			
	200	161.87	80.9			
	500	451.19	90.2			
	1000	1362.12	136.2			
纯净水	50	38.33	76.7	88.2	18.13	16.01
	100	100.75	100			
	200	150.12	75.1			
	500	393.86	78.8			
	1000	1104.76	110.5			
蒸馏水	50	44	88	97.01	3.9	8.77
	100	115	115			
	200	172.45	86.2			
	500	408.15	81.6			
	1000	1142.18	114.2			
池塘水	50	67.27	134.5	120.6	21.27	17.67
	100	143.12	143			
	200	192.34	96			
	500	456.56	91			
	1000	1388.02	138.6			
平均值				100.2		15.14

[0054] 从结果可以看出用荧光标记半抗原 BMPA-HDF 建立的极化荧光免疫检测方法回收率较高, 变异系数较小, 准确度和稳定性可以满足检测需要。

[0055] 本发明所建立的方法, 室温即可操作, 整个反应时间 15min 或者更短, 96 孔微孔板上可同时检测 96 个样品, 一步完成, 不需洗涤, 配备机械手后可实现加样、读数自动化, 本发明方法可用于丁草胺残留的快速检测。

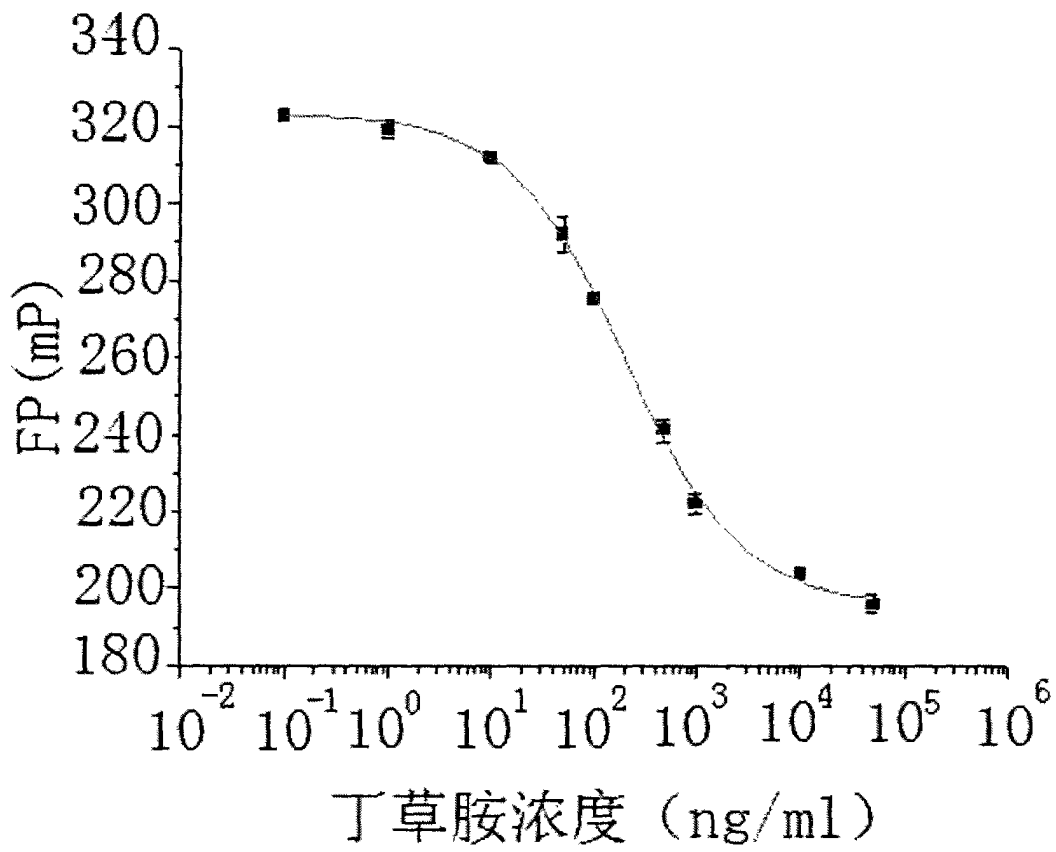


图 1

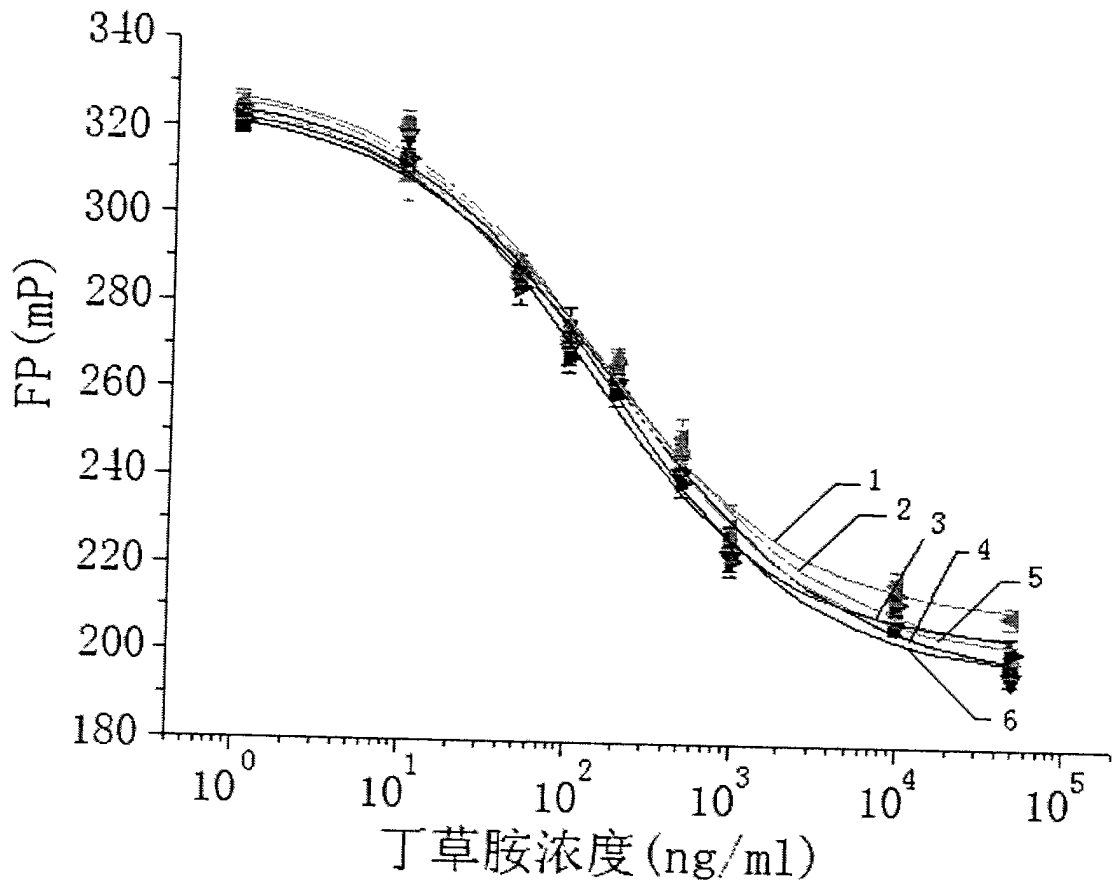


图 2

专利名称(译)	丁草胺极化荧光免疫检测方法		
公开(公告)号	CN101368946B	公开(公告)日	2012-05-30
申请号	CN200810029088.4	申请日	2008-06-27
[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	雷红涛 吴青 薛钢 沈玉栋 孙远明 王弘 徐小艳 李美英 肖治理 柳春红		
发明人	雷红涛 吴青 薛钢 沈玉栋 孙远明 王弘 徐小艳 李美英 肖治理 柳春红		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/76 G01N33/577		
代理人(译)	林丽明 任重		
其他公开文献	CN101368946A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种丁草胺极化荧光免疫检测方法，包括将待分析样品和荧光标记半抗原混合、加入丁草胺抗体、直接测量反应体系的极化荧光信号、根据丁草胺标准样品建立的标准曲线计算待分析样品中丁草胺浓度等步骤。本发明所建立的方法，室温即可操作，整个反应时间很短，可同时检测多个样品，一步完成，不需洗涤，配备机械手后可实现加样、读数自动化，是一种高通量、自动化免疫检测方法。

