

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/535 G01N 33/543

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02112004.8

[43] 公开日 2002 年 12 月 18 日

[11] 公开号 CN 1385703A

[22] 申请日 2002.6.7 [21] 申请号 02112004.8

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区玉古路 20 号

[72] 发明人 朱国念 吴慧明 杨 挺 程敬丽

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司

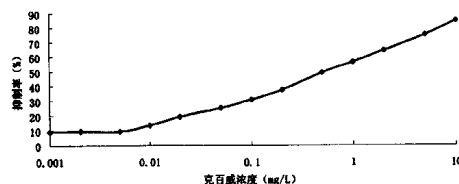
代理人 张法高

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称 适用于克百威残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种适用于克百威残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒,它包括盒体、设在盒体内的 96 孔/40 孔酶标板和设在盒体内的试剂,其特征在于,在酶标板的每孔内,由包被液包被能与抗克百威抗体特异性结合反应的包被抗原,并用 1.0~3.0% 脱脂奶粉进行封闭,盒内试剂包含洗涤液、底物稀释液、克百威标准溶液、抗克百威抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体、底物、显色物质和反应终止液。本发明的优点是能用于水、土壤、蔬菜、中毒样品中克百威残留的检测,样品的前处理过程简单,耗时少,能同时检测大批量的样品,样品检测成本远低于传统的检测方法。试剂盒采用强特异性、高效价的抗体,提高检测的灵敏度、准确度、精密度。试剂盒的保存期超过 6 个月。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种适用于克百威残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒, 它包括盒体、设在盒体内的 96 孔/40 孔酶标板和设在盒体内的试剂, 其特征在于, 在酶标板的每孔内, 由包被液包被能与抗克百威抗体特异性结合反应的包被抗原, 并用 1.0~3.0% 脱脂奶粉进行封闭, 盒内试剂包含洗涤液、底物稀释液、克百威标准溶液、抗克百威抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体、底物、显色物质和反应终止液。

2. 根据权利要求 1 所述的一种适用于克百威残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒, 其特征在于所说的包被抗原为 6-[[[(2, 3-二氢-2, 2-二甲基-7-苯并呋喃基氧)羰基] 氨基] 己酸与卵清蛋白的复合物或 4-[[[(2, 3-二氢-2, 2-二甲基-7-苯并呋喃基氧)羰基] 氨基] 丁酸与卵清蛋白的复合物。

3. 根据权利要求 1 所述的一种适用于克百威残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒, 其特征在于所说的洗涤液内含有氯化钠 7~9g、磷酸二氢钾 0.1~0.3g、磷酸氢二钠 2~4g、氯化钾 0.1~0.3g、吐温-20 0.5~3mL、双蒸水。

4. 根据权利要求 1 所述的一种适用于克百威残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒, 其特征在于所说的底物稀释液内含有柠檬酸 3~6g, 磷酸氢二钠 1~3g, 双蒸水。

5. 根据权利要求 1 所述的一种适用于克百威残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒, 其特征在于所说的酶底物为过氧化氢或过氧化尿素。

6. 根据权利要求 1 所述的一种适用于克百威残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒, 其特征在于所说的显色物质为邻苯二胺。

7. 根据权利要求 1 所述的一种适用于克百威残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒, 其特征在于所说的反应终止液为硫酸或盐酸。

8. 根据权利要求 1 所述的一种适用于克百威残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒, 其特征在于所说的碳酸盐缓冲溶液, 含 1~2g 碳酸钠和 2~4g 碳酸氢钠, 双蒸水 1L。

适用于克百威残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒 技术领域

本发明涉及一种适用于克百威残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒，主要适用于用该试剂盒快速测定大批量蔬菜、水、土壤、中毒等环境、食品等样品中的克百威残留。

背景技术

农药及其代谢物传统的残留分析方法主要是依靠气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)、质谱(MS)等物理化学分析手段，但由于农药使用规模不断扩大，农药残留造成环境影响和人类健康的慢性和长期效应日益受到人们关注和担忧，对农药残留的限制也越来越严格，对分析测定对象、种类、数量、范围、指标等诸方面都提出了新的要求和更高的标准，但传统的理化分析方法通常繁琐复杂，样品前处理过程复杂，工作量大，仪器昂贵，并要求有熟练的技术人员及较长的分析周期。因此人们迫切希望有一种简单，快速，灵敏及廉价的检测技术能在野外和实验室内进行大批量的筛选试验。免疫分析法正具备这些优点，所以尽管免疫分析用于农药残留分析的时间很短，但已很快用于环境样品和食品中农药残留的分析。

克百威(Carbofuran, 2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并呋喃基-N-甲基氨基甲酸酯, 商品名呋喃丹), 自 1969 年由 FMC 公司和 Mobay 化学公司开发生产后即作为一种高效和、广谱的杀虫、杀线虫剂, 在世界范围内广泛应用于粮食、蔬菜、水果及经济作物的害虫防治。但是由于克百威的毒性大, 在酸性土壤中不易降解, 极易污染土壤和地下水源。近年来, 由于克百威造成的环境生物毒害, 屡见不鲜。尤其是在作物和蔬菜上的大量使用, 对人体健康造成极大的危害, 这已引起人们的关注。因此, 开发一种简单快速, 适用于农药残留现场监控的痕量分析方法具有重要的现实意义。

检测克百威残留量常规方法有气相色谱法和高效液相色谱法。由于克百威在象其它大多数 N-甲基氨基甲酸酯农药一样具热不稳定性, 在一般的气谱操作条件下易降解成酚类。虽然这些问题可通过改变操作条件]或将农药衍生化来解决, 目前指定的检测 N-甲基氨基甲酸酯类农药的较灵敏的方法是用带荧光检测器的 HPLC 柱后衍生化法 (EPA 方法 531.1)。然而该方法的灵敏度受样品的净化、浓缩、衍生化等步骤的影响很大。再者该方法需要大多数实验室所不

具备的复杂的仪器（如荧光检测器），且过程繁琐，不适合大批量样品的检测与分析。免疫分析为克百威的残留检测提供了一个新的分析检测途径。目前已有克百威免疫分析方法的报道，但要将免疫分析方法运用到实际中，还需要将其研制成试剂盒。

发明内容

本发明的目的是提供一种具有高特异性、高灵敏度、高准确度、高精度、操作方法简单快速，并能用于大批量样品快速检测的适用于克百威残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒。

它包括盒体、设在盒体内的 96 孔/40 孔酶标板和设在盒体内的试剂，其特征在于，在酶标板的每孔内，由包被液包被能与抗克百威抗体特异性结合反应的包被抗原，并用 1.0~3.0%脱脂奶粉进行封闭，盒内试剂包含洗涤液、底物稀释液、克百威标准溶液、抗克百威抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体、底物、显色物质和反应终止液。

本发明的优点是能用于水、土壤、蔬菜、中毒样品中克百威残留的检测，样品的前处理过程简单，耗时少，能同时检测大批量的样品，样品检测成本远低于传统的检测方法。试剂盒采用强特异性、高效价的抗体，提高检测的灵敏度、准确度、精密度。试剂盒的保存期超过 6 个月。本发明简单快速，适用于农药残留现场监控的痕量分析方法具有重要的现实意义。

附图说明

附图是克百威标准曲线图。

具体实施方式

本发明是一种适用于克百威残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒，它基于免疫反应和酶促反应，能够检测水、土壤、蔬菜、中毒样品中克百威的残留。它包括盒体、设在盒体内的 96 孔/40 孔酶标板和设在盒体内的试剂，其特征在于，在酶标板的每孔内，由包被液包被能与抗克百威抗体特异性结合反应的包被抗原，并用 1.0~3.0%脱脂奶粉进行封闭，盒内试剂包含洗涤液(稀释液)、底物稀释液、克百威标准溶液、抗克百威抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体、底物、显色物质和反应终止液，其中：(1)包被抗原 6-[[[(2, 3-二氢-2, 2-二甲基-7-苯并呋喃基氧)羰基] 氨基]己酸与卵清蛋白的复合物(BFNB-OVA)或 4-[[[(2, 3-二氢-2, 2-二甲基-7-苯并呋喃基氧)羰基] 氨基]丁酸与卵清蛋白的复合物(BFNH-OVA)。用 pH9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液(含 1~2g 碳酸钠和 2~4g 碳酸氢钠，双蒸水 1L) 稀释成 0.1~1 μ g/mL，(2)洗涤液(稀释液)一瓶，40~

80mL/瓶, 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 0.1~0.3g、吐温-20 0.5~3mL、双蒸水, 为正常使用的 15~30 倍浓缩液; (3)底物稀释液一瓶, 30~50mL/瓶, 配制如下: 柠檬酸 3~6g, 磷酸氢二钠 1~3g, 双蒸水, 为正常使用的 5~10 倍浓缩液; (4)酶底物为过氧化氢一瓶, 1~5mL/瓶; (5)显色物质为邻苯二胺(OPD)6~10 支, 8~15mg/支; (6)抗克百威抗体由克百威免疫原免疫兔子制备而得, 稀释成蛋白浓度为 0.5~4.0 μ g/mL 使用, 一瓶, 100~200 μ L/瓶, 为正常使用 800~1500 倍浓缩液; (7)辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体, 一瓶, 100~200 μ L/瓶, 为正常使用 800~1500 倍浓缩液; (8)反应终止液一瓶, 30~50mL/瓶, 为 2mol/L 硫酸; (9)克百威不同浓度系列(0.05、0.5、2、10、50、100mg/L) 标准液 6 瓶, 1~4mL/瓶, 甲醇定容, 使用时用 PBST 稀释 10 倍。这种试剂盒的特异性好, 丁硫克百威和呋喃酚的交叉反应率低于 7.00%, 与供试的其它氨基甲酸酯类农药和有机磷类农药的交叉反应率均小于 0.44%, 试剂盒的最低检测限为 0.005mg/L, 线性检测范围为 0.005~10mg/L, 样品检测的批内、批间、整体变异系数均低于 8.00%之间, 回收率均高于 89.62%。试剂盒在 4℃或保存期 20℃下至少可保存 6 个月以上。

实施例 1

其测定原理是, 首先将农药分子与大分子载体(如蛋白质)偶联制得的复合物作为包被抗原吸附于固相载体上, 然后加入待测农药和相应抗体, 固相抗原上的农药, 待测农药与抗体进行竞争反应, 待测农药含量多, 则被结合在固相抗原上的抗体少, 反之结合在固相抗原的抗体多, 反应后加入酶标二抗(只能与结合在固相抗原上的抗体相结合), 最后用底物进行显色加以测定, 当抗体量一定时, 加入的待测农药量越多, 与固相抗原结合的抗体就越少, 发色反应减弱, 抑制率增高, 反之, 则发色反应增强, 抑制率减低, 因而根据已知量农药的标准线和待检样品的抑制率, 再根据抑制率与农药浓度之间的半对数关系作图即得标准曲线, 并推算出待测农药的浓度。

实施例 2

包被酶标板的制备, 包被抗原(BFNB-OVA 或 BFNH-OVA)用 pH9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液(含 1~2g 碳酸钠和 2~4g 碳酸氢钠, 双蒸水 1L)稀释成 0.1~1 μ g/mL, 在酶标板的每孔加 100 μ L, 4℃下包被过夜或 37℃包被 2h, 倾去包被液, 用 PBST 洗涤 3 次, 拍干, 然后在每孔中加入 150 μ L 1.0~3.0%脱脂奶粉, 放入 37℃温箱中 0.4~1 小时后用 PBST 洗涤 3 次, 拍干后干燥保存。

实施例 3

检测样品的前处理:

水样: 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。

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, 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 4

试剂盒操作过程如下: 取出一块包被有克百威包被抗原酶标板, 恢复到室温后备用; 加入 50μL 标样或处理好的样品到各自孔中, 标样和样品做 2~4 个重复; 加入 50μL 稀释的抗体, 37℃孵育 1~2 小时; 倒出孔中的液体, 将微孔板倒置在吸水纸上拍打, 以保证完全除去孔中的液体, 用 200μL 稀释好的 PBST 洗 2~6 次; 加入 100μL 稀释好酶标二抗, 37℃孵育 1~2 小时; 倒出孔中的液体, 将微孔板倒置在吸水纸上拍打, 以保证完全除去孔中的液体, 用 200μL 稀释好的 PBST 洗 2~6 次; 底物溶于底物溶液后, 加入过氧化氢 40μL, 然后每孔加入 100μL 显色液, 轻微振匀, 并在 37℃暗处孵育 15~25 分钟; 加入 50μL 反应终止液, 混合好后, 测定 OD₄₉₀ 值。

以所获得的标样和样品吸光值的平均值计算各孔的吸光值的抑制率

$$\text{抑制率}(\%) = \text{抑制率}(\%) = \frac{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\min})}{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min})} \times 100\%$$

OD_{max} 为不加药时的吸光值, OD_x 为农药 x 时的吸光值, OD_{min} 为空白对照孔的吸光值

计算的标样值绘成为一个对应克百威浓度 (mg/L) 的半对数坐标系统曲线图, 校正曲线在 0.005~10mg/L 范围内为线性, 对应样品浓度可从校正曲线读出, 也可根据标样的浓度与抑制率求出线性方程, 然后求出对应样品的浓度。

实施例 5

保存期试验

将试剂盒放置于 4℃和-20℃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 试剂盒保存期试验结果

Table1 Validity of ELISA kit

时间(d)		0	10	20	30	60	90	120	150	180
温度(℃)	4	1.142	1.141	1.139	1.140	1.138	1.137	1.133	1.128	1.120
	-20	1.142	1.142	1.141	1.141	1.140	1.141	1.139	1.140	1.138

以上结果可以看出，试剂盒在 4℃和-20℃下至少可保存 6 个月以上。

实施例 6

试剂盒灵敏度测定

将克百威稀释成不同浓度，按试剂盒操作方法进行操作，得克百威免疫反应标准曲线，由（图 1）即可得其灵敏度。 $y = 5.2082 + 0.6746x$ ，克百威在 0.005mg/L~10mg/L 范围内，Logit(B/B₀)与克百威浓度的对数值呈显著的线性关系，相关系数为 $r^2 = 0.9966$ ，检出限为 0.005mg/L。

实施例 7

试剂盒特异性试验

选择克百威的代谢物（呋喃酚）、氨基甲酸酯类农药（丁硫克百威、甲萘威、异丙威、速灭威、灭多威、仲丁威）与有机磷农药（甲胺磷、久效磷、敌敌畏），反应步骤同试剂盒操作，得到各种农药抑制中浓度。再用下式计算农药对克百威的交叉反应性。交叉反应率愈小，反应的特异性愈强。交叉反应率愈大，交叉反应率可按下式计算，

$$\text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{抑制率为50\%克百威的浓度}}{\text{抑制率为50\%其他农药的浓度}} \times 100\%$$

本试验测定结果见表 2。从表 2 可以知道，间接 ELISA 法抑制率达 50%时，克百威所需浓度为 0.49mg/L，降解产物呋喃酚所需浓度为 12.28mg/L，结构类似物丁硫克百威所需浓度为 7.94mg/L，而其它五种氨基甲酸酯类农药所需浓度为均大于 200mg/L，而有机磷农药则均大于 400mg/L。抗体与丁硫克百威、呋喃酚的交叉反应略高，分别为 6.19%、4.00%，而与其它五种氨基甲酸酯类农药和三种有机磷农药几乎无交叉反应（小于 0.44%）。说明该试剂盒的特异性好，可保证对样品中克百威残留测定结果的可靠性。

表 2 试剂盒特异性试验

Table2 Recognition of Several Compounds by ELISA kit

化合物名称	抑制中浓度 (mg/L)	交叉反应百分率 (%)
克百威	0.49	/
呋喃酚	12.28	4.00
丁硫克百威	7.94	6.19
异丙威	112.5	0.44
速灭威	>200	<0.24
灭多威	>200	<0.24
甲萘威	>200	<0.24
仲丁威	>200	<0.24
甲胺磷	>400	<0.12
久效磷	>400	<0.12
敌敌畏	>400	<0.12

实验例 8

准确度试验

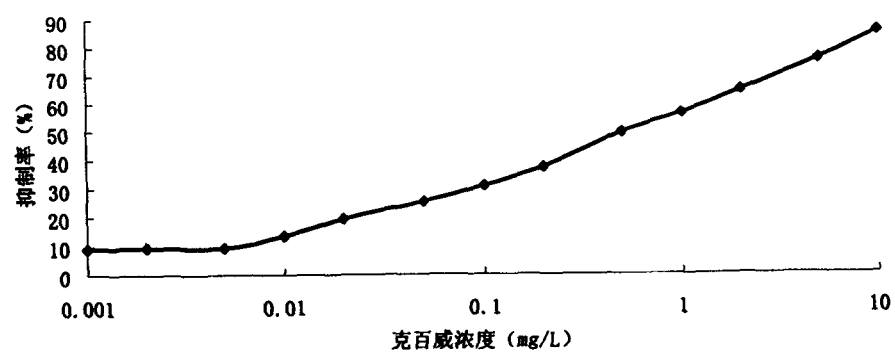
取三个浓度的克百威标样，添加到样品中，每个浓度设 6 个重复，进行测定。

试剂盒回收率的结果如下，水为 99.12%~114.24%，土壤为 93.06%~98.42%，蔬菜为 89.62%~99.72%，中毒样品(定性检验)为 59.71%~98.42%。

实施例 9

精密度试验

取三个浓度的克百威标样，添加到样品中，每个浓度设 6 个重复，分别在 6 天进行测定。结果如下，水的变异系数均低于 7.44%，土壤的变异系数均低于 7.97%，蔬菜的变异系数均低于 7.00%，中毒样品的变异系数均低于为 7.21%。



专利名称(译)	适用于克百威残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒		
公开(公告)号	CN1385703A	公开(公告)日	2002-12-18
申请号	CN02112004.8	申请日	2002-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	朱国念 吴慧明 杨挺 程敬丽		
发明人	朱国念 吴慧明 杨挺 程敬丽		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种适用于克百威残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒,它包括盒体、设在盒体内的96孔/40孔酶标板和设在盒体内的试剂,其特征在于,在酶标板的每孔内,由包被液包被能与抗克百威抗体特异性结合反应的包被抗原,并用1.0~3.0%脱脂奶粉进行封闭,盒内试剂包含洗涤液、底物稀释液、克百威标准溶液、抗克百威抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体、底物、显色物质和反应终止液。本发明的优点是能用于水、土壤、蔬菜、中毒样品中克百威残留的检测,样品的前处理过程简单,耗时少,能同时检测大批量的样品,样品检测成本远低于传统的检测方法。试剂盒采用强特异性、高效价的抗体,提高检测的灵敏度、准确度、精密度。试剂盒的保存期超过6个月。

