

[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 200610122594.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2007年6月27日

[11] 公开号 CN 1987469A

[22] 申请日 2006.9.30

[21] 申请号 200610122594.9

[71] 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山华南
农业大学

[72] 发明人 孙远明 杨金易 潘科 王弘
吴青 雷红涛 肖治理 谌国莲
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 陈卫

权利要求书2页 说明书6页

[54] 发明名称

一种检测克百威酶联免疫分析方法

[57] 摘要

本发明公开了一种检测克百威的酶联免疫分析方法，包括：(1)合成半抗原和人工抗原；(2)制备对克百威具特异性的多克隆抗体、单克隆抗体或基因工程抗体；(3)制备酶标抗原；(4)用第二抗体包被酶标板并封闭，加入抗克百威抗体与第二抗体反应并固定于酶标板上；(5)洗涤去除游离物，加入待测样品及酶标抗原或克百威标样及酶标抗原；(6)洗涤去除游离物，加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与结合在抗体上的酶标抗原量成正比，与样品或标样中克百威的含量成反比。本发明采用第二抗体预包被酶标板，节约了克百威抗体用量，可长期保存，提高了灵敏度、准确度和精密性；检测操作简单、快速、能同时检测大批量的样品。

1、一种检测克百威的酶联免疫分析方法，其特征在于，包括如下步骤：

- (1) 合成半抗原和人工抗原；
- (2) 将人工抗原免疫动物制备对克百威具特异性的多克隆抗体、单克隆抗体或基因工程抗体；
- (3) 用辣根过氧化物酶标记半抗原制备酶标抗原；
- (4) 用第二抗体包被酶标板并封闭，加入抗克百威抗体与第二抗体反应并固定于酶标板上；
- (5) 洗涤去除游离物，加入待测样品及酶标抗原或克百威标样及酶标抗原；
- (6) 洗涤去除游离物，加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与结合在抗体上的酶标抗原量成正比，与样品或标样中克百威的含量成反比，因而根据已知量的克百威标准曲线和待检样品的抑制率，再根据抑制率与克百威浓度之间的半对数关系作图得到标准曲线，从而推算出待测克百威的浓度。

2、根据权利要求 1 所述的检测克百威的酶联免疫分析方法，其特征在于，所述半抗原是 6-[[(2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并呋喃基氧)羰基)氨基]己酸或 4-[[(2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并呋喃基氧)羰基)氨基]丁酸。

3、根据权利要求 2 所述的检测克百威的酶联免疫分析方法，其特征在于，所述半抗原是以呋喃酚与光气反应生成氯甲酸呋喃酚酯，

再与氨基酸缩合合成的两种半抗原。

4、根据权利要求1所述的检测克百威的酶联免疫分析方法，其特征在于，所述人工抗原是半抗原与载体蛋白共价偶联合成的人工抗原。

5、根据权利要求1所述的检测克百威的酶联免疫分析方法，其特征在于，步骤（2）所述多克隆抗体是以人工抗原与弗氏佐剂混合乳化后免疫动物制备；所述单克隆抗体是采用杂交瘤技术制备；所述基因工程抗体是采用基因工程技术制备的。

6、根据权利要求1所述的检测克百威的酶联免疫分析方法，其特征在于，所述酶标抗原是采用混合酸酐法或活性酯法将半抗原与辣根过氧化物酶共价偶联而成。

7、根据权利要求1所述的检测克百威的酶联免疫分析方法，其特征在于，所述酶标板是聚苯乙烯微孔板。

8、根据权利要求1所述的检测克百威的酶联免疫分析方法，其特征在于，步骤（4）所述封闭是采用1.0~5.0%脱脂奶粉进行封闭。

一种检测克百威酶联免疫分析方法

技术领域

本发明涉及酶联免疫分析方法，具体地说，涉及一种检测克百威的酶联免疫分析方法。

背景技术

克百威（carbofuran，化学名 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、广谱的杀虫剂，广泛应用于粮食、蔬菜、水果及经济作物的害虫防治。克百威是一种胆碱酯酶抑制剂，对人和野生动物具有很高的毒性（小鼠经口 LD₅₀ 为 8mg/kg），是蔬菜农药残留规定中不得检出的一种，但由于杀虫效果较好，目前在粮食和蔬菜上存在不合理使用的现象比较严重，对公众健康具有较大的危害。另外，克百威在酸性土壤中不易降解，极易污染土壤和地下水源，容易造成环境污染。因此，除加强克百威的使用管理，从源头控制的同时，还应加强对其的检测与监管，防止其进入食物链中。

目前，检测克百威残留的常规方法有气相色谱法（GC）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，因此，开发克百威特异、灵敏，且适于现

场大批量样品快速筛选的酶联免疫分析方法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性强、灵敏度高、稳定性好、操作简单快速,适合环境和农产品中大批量检测克百威的酶联免疫分析方法。

一种检测克百威的酶联免疫分析方法,包括如下步骤:

- (1) 合成半抗原和人工抗原;
- (2) 将人工抗原免疫动物制备对克百威具特异性的多克隆抗体、单克隆抗体或基因工程抗体;
- (3) 用辣根过氧化物酶标记半抗原制备酶标抗原;
- (4) 用第二抗体包被酶标板并封闭,加入抗克百威抗体与第二抗体反应并固定于酶标板上;
- (5) 洗涤去除游离物,加入待测样品及酶标抗原或克百威标样及酶标抗原;
- (6) 洗涤去除游离物,加入酶的底物和显色剂,酶促显色反应的强度与结合在抗体上的酶标抗原量成正比,与样品或标样中克百威的含量成反比,因而根据已知量的克百威标准曲线和待检样品的抑制率,再根据抑制率与克百威浓度之间的半对数关系作图得到标准曲线,从而推算出待测克百威的浓度。

在上述检测克百威的酶联免疫分析方法中,所述半抗原是6-[((2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并呋喃基氧)羰基)氨基]己酸或4-[((2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并呋喃基氧)羰基)氨基]丁酸。该

半抗原是以呋喃酚与光气反应生成氯甲酸呋喃酚酯，再与氨基酸缩合合成的两种半抗原。

在上述检测克百威的酶联免疫分析方法中，所述人工抗原是半抗原与载体蛋白共价偶联合成的人工抗原。

在上述检测克百威的酶联免疫分析方法中，步骤（2）所述多克隆抗体是以人工抗原与弗氏佐剂混合乳化后免疫动物制备的；所述单克隆抗体是采用杂交瘤技术制备的；所述基因工程抗体是采用基因工程技术制备的。

在上述检测克百威的酶联免疫分析方法中，所述酶标抗原是采用混合酸酐法或活性酯法将半抗原与辣根过氧化物酶共价偶联而成。

在上述检测克百威的酶联免疫分析方法中，所述酶标板是聚苯乙烯微孔板。

在上述检测克百威的酶联免疫分析方法中，所述封闭是采用1.0~5.0%脱脂奶粉进行封闭。

本发明的检测克百威的酶联免疫分析方法的测定原理是，首先将抗抗体（第二抗体）吸附于固体载体上，然后加入人工制备的抗克百威抗体，再加入酶标抗原与待测农药，酶标抗原与待测农药竞争抗克百威抗体，待测农药含量高时，则与克百威抗体结合的酶标抗原就少，反之结合在克百威抗体的酶标抗原就多，反应后加入底物进行显色加以测定，当克百威抗体量一定时，加入的待测农药量越多，与克百威抗体结合酶标抗原就越少，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，因而根据已知量的农药的标准曲线和待检

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。

与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：1、本发明采用第二抗体预包被酶标板，节约了克百威抗体的用量，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、本发明采用高特异性、高亲合力的抗克百威抗体，提高了检测的灵敏度、准确度和精密度。3、本发明的检测方法能用于水、土壤、农产品等样品中克百威残留的检测，操作简单、快速，能同时检测大批量的样品，成本远低于传统克百威检测方法，适用于农药克百威残留现场监控的痕量分析，具有重要的现实意义。

具体实施方式

实施例 1

1、缓冲液的配制 缓冲液（pH7.4 PBST） KH_2PO_4 0.4g， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.8g，NaCl 16g，KCl 0.4g，Tween-20 0.05% 1mL，加蒸馏水至 2000mL。

2、封闭液的配制 脱脂奶粉 3.0 g 溶于 100mL 蒸馏水。

3、底物液的配制 30%过氧化氢 30 μL 溶于 19mL 的显色液（pH5.0 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）中，4 $^\circ\text{C}$ 保存。

4、底物缓冲液的配制 邻苯二胺 OPD80mg 溶于 10ml 底物液中，4 $^\circ\text{C}$ 保存。

5、微孔板的包被 第二抗体用 pH9.6，0.05mol/L 的碳酸盐缓冲

溶液（含 2g 碳酸钠和 4g 碳酸氢钠，双蒸水 1L）稀释成 4ug/ml，在酶标板的每孔加 100ul，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 200ul 3.0%脱脂奶粉，放入 37℃温箱中 1h 后用 PBST 洗涤 3 次，拍干后干燥保存。

6、克百威标样溶液的配制 准确称取克百威标样 10mg，溶于 0.1L 缓冲液中，然后用缓冲液 10 倍梯度稀释分别配制 10mg/L、1mg/L、0.1mg/L、0.01mg/L、0.001 mg/L 克百威溶液，另外缓冲液配制 0mg/L 对照样，4℃保存。

7、克百威抗体溶液的制备 用缓冲液适当稀释抗体，4℃保存备用。

8、酶标抗原的制备：

利用混合酸酐法，使 HRP 标记半抗原 6-[（2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并呋喃基氧）羰基]氨基]己酸（BFNH），具体方法为：

①称取 10mg 的 HRP（250nmol）于玻璃容器中，用 0.5mL 的去离子水溶解，加入 2μL 双蒸的三正丁胺，485μL 的 DMF，轻轻混匀，冰浴保存。

②取半抗原，加入 275μL DMF 溶解，加入 1.2 摩尔比的三正丁胺，加入 1.2 摩尔比的氯甲酸异丁酯，活化 5min。

③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。

④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。

取出一块包被有第二抗体的酶标板，恢复到室温后备用；加入100ul 克百威抗体到各自孔中，37℃孵育 0.5h，洗板，加入酶标抗原和一系列稀释度的克百威标样溶液进行竞争反应，37℃孵育 1h，洗板，OPD 37℃避光显色 15min，硫酸终止，酶标仪 490nm 测定结果。

以所获样品吸光值的平均值计算抑制率，抑制率的计算公式为：

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(A_{\max} - A_{\min}) - (A_x - A_{\min})}{A_{\max} - A_{\min}} \times 100$$

其中， A_{\max} 为不加农药时的吸光值， A_x 为农药浓度为 x 时的吸光值， A_{\min} 为空白对照孔的吸光值。

以抑制率为纵坐标，克百威浓度 (mg/L) 的半对数为横坐标绘制标准曲线，求出曲线方程，对应样品的浓度可以根据方程求出。

专利名称(译)	一种检测克百威酶联免疫分析方法		
公开(公告)号	CN1987469A	公开(公告)日	2007-06-27
申请号	CN200610122594.9	申请日	2006-09-30
[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 潘科 王弘 吴青 雷红涛 肖治理 谌国莲 沈玉栋		
发明人	孙远明 杨金易 潘科 王弘 吴青 雷红涛 肖治理 谌国莲 沈玉栋		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/547 G01N21/78 G01N33/53		
代理人(译)	陈卫		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测克百威的酶联免疫分析方法，包括：(1)合成半抗原和人工抗原；(2)制备对克百威具特异性的多克隆抗体、单克隆抗体或基因工程抗体；(3)制备酶标抗原；(4)用第二抗体包被酶标板并封闭，加入抗克百威抗体与第二抗体反应并固定于酶标板上；(5)洗涤去除游离物，加入待测样品及酶标抗原或克百威标样及酶标抗原；(6)洗涤去除游离物，加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与结合在抗体上的酶标抗原量成正比，与样品或标样中克百威的含量成反比。本发明采用第二抗体预包被酶标板，节约了克百威抗体用量，可长期保存，提高了灵敏度、准确度和精密度；检测操作简单、快速、能同时检测大批量的样品。

