



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101526524 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 23

(21) 申请号 200810101542. 2

(22) 申请日 2008. 03. 07

(73) 专利权人 中国农业大学

地址 100083 北京市海淀区清华东路 17 号

(72) 发明人 许艇 李季 高宏斌

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王朋飞

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1624480 A, 2005. 06. 08,

CN 1789283 A, 2006. 06. 21,

骆爱兰等. 拟除虫菊酯类农药多残留酶免疫分析方法的建立. 《中国农业科学》. 2005, 第 38 卷 (第 2 期), 全文.

masanobu nakata et al. A monoclonal antibody-based ELISA for the analysis

of the insecticide flucythrinate in environmental and crop samples. 《Pest management science》. 2001, 第 57 卷全文.

审查员 黎舒婷

权利要求书 1 页 说明书 7 页

(54) 发明名称

氰戊菊酯残留的间接竞争酶联免疫吸附分析试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了一种适用于氰戊菊酯残留检测的酶联免疫吸附分析试剂盒, 包括包被氰戊菊酯抗原的酶标板、浓缩洗涤液、氰戊菊酯标准品、氰戊菊酯特异性抗体、酶标记物、底物显色液和反应终止液。本发明的优点是能准确灵敏地检测水中氰戊菊酯残留, 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。

1. 一种检测氰戊菊酯残留的酶联免疫吸附分析试剂盒,包括包被氰戊菊酯抗原的酶标板、浓缩洗涤液、氰戊菊酯标准品、氰戊菊酯特异性抗体、酶标记物、底物显色液和反应终止液,其特征在于制备氰戊菊酯特异性抗体的免疫原为 3-[(±) 氰基 [(CIS) 2-[3- 氯苯基] 3- 甲基丁羰基氧基] 苯氧基] 苯丙酸与载体蛋白的偶联复合物;所述氰戊菊酯抗原为 3-[(±) 氰基 [(CIS) 2-[3- 氯苯基] 3- 甲基丁羰基氧基] 苯氧基] 苯丙酸与载体蛋白的偶联复合物。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述酶标记物为酶标记二抗。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述的浓缩洗涤液的配方为每 20mL 蒸馏水中加入有氯化钠 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 -200.5 ~ 3mL。

4. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,当酶标记物中使用的标记酶为辣根过氧化物酶时,底物显色液包括 A 液和 B 液,所述 A 液为过氧化氢或过氧化脲、所述 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺、终止液为 1 ~ 2mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液;当酶标记物中使用的标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时,底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止液为 2mol/L 的氢氧化钠。

5. 根据权利要求 4 所述的试剂盒,其特征在于,所述 A 液配方为每 1000mL 水中加入过氧化脲 1g, 10.3g 柠檬酸, 35.8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 吐温 -20 100 μL , pH5;所述 B 液配方为每 1000mL 蒸馏水中加入四甲基联苯胺 700mg, 10.3g 柠檬酸, pH2.4-2.8。

6. 权利要求 1 ~ 5 任一项所述试剂盒在检测氰戊菊酯残留中的应用。

氰戊菊酯残留的间接竞争酶联免疫吸附分析试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种氰戊菊酯残留的间接竞争酶联免疫吸附分析 (ELISA) 试剂盒, 主要适用于大批量水样品中氰戊菊酯残留的快速测定。

背景技术

[0002] 氰戊菊酯是一种合成菊酯类农药, 由于杀虫谱广、供应充足, 价格又相对较低, 因此在茶叶生产中应用普遍。在我国, 氰戊菊酯主要用于棉花、茶叶、果树和蔬菜种植中。然而, 氰戊菊酯是一种高毒物质, 对于大鼠急性经口 LD₅₀ 为 451mg/kg, 而对于鱼类和水生的无脊椎动物的毒性更高。目前氰戊菊酯已成为影响我国茶叶出口的一个重要限制因素。

[0003] 常用的氰戊菊酯的分析方法主要有高压液相色谱法, 气相色谱连接电子捕获检测器法和液质联用法。应用这些理化分析技术对环境、生物、食品等样品中痕量氰戊菊酯残留进行分析, 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, 又造成了新的环境污染。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。

发明内容

[0004] (一) 要解决的技术问题

[0005] 为了解决目前农药残留仪器分析方法成本高和操作复杂以及快速检测技术中特异性差、灵敏度低和检测结果不稳定等缺点, 本发明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, 并能用于大批量样品快速检测的氰戊菊酯残留的间接竞争酶联免疫吸附分析试剂盒。

[0006] (二) 技术方案

[0007] 本发明试剂盒包括包被氰戊菊酯抗原的酶标板、浓缩洗涤液、氰戊菊酯标准品、氰戊菊酯特异性抗体、酶标记物、底物显色液和反应终止液。

[0008] 其中, 所述包被抗原是 3-[(±) 氰基 [(CIS) 2-[3- 氯苯基] 3- 甲基丁羰基氧基] 苯氧基] 苯丙酸与载体蛋白的偶联复合物, 所述载体蛋白优选为卵清蛋白。

[0009] 其中所述氰戊菊酯特异性抗体是由 3-[(±) 氰基 [(CIS) 2-[3- 氯苯基] 3- 甲基丁羰基氧基] 苯氧基] 苯丙酸与载体蛋白偶联作为免疫原制备获得, 可以通过杂交瘤方法制备得到的单克隆抗体, 或者是直接免疫动物得到的多克隆抗体。所述, 载体蛋白可为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白 (BCG)、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白等常用载体蛋白, 优选为牛血清白蛋白; 所述多克隆抗体可以是鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体, 优选为兔源多克隆抗体。

[0010] 其中, 包被抗原的酶标板的制备过程中, 所用包被液可以是 0.05M pH 9.6 碳酸钠缓冲液, 所用封闭液是含 1% 明胶的上述包被液。

[0011] 其中, 酶标记物为酶标二抗, 标记酶可以是辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

[0012] 其中,浓缩洗涤液的配方为每 20mL 蒸馏水中加入氯化钠 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 0.5 ~ 3mL。浓缩洗涤液的浓度是正常使用时的 50 倍。

[0013] 当标记酶为辣根过氧化物酶时,底物显色液由 A 液和 B 液组成,显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲,显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,终止液为 1 ~ 2mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液。具体地说,A 液配方可为每 1000mL 水中加入过氧化脲 1g,10.3g 柠檬酸,35.8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,吐温 -20 100 μL ,pH5 ;B 液配方可为每 1000mL 蒸馏水中加入四甲基联苯胺 (TMB) 700mg (40mL DMSO 溶解),10.3g 柠檬酸,pH2.4-2.8。当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时,底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止液为 2mol/L 的氢氧化钠。

[0014] 本发明试剂盒的分析原理是:

[0015] 当酶标板预包被抗原时,加入待测氰戊菊酯样品和多克隆抗体,固相包被抗原和待测氰戊菊酯相互竞争与抗体反应,由于每个孔中的固相抗原和加入的抗体含量均一致,所以当待测的氰戊菊酯浓度高时,则被结合在固相抗原上的抗体少,加入的酶标二抗与被固定抗体结合量少,最后加入底物液和显色液,显色反应浅,用酶标仪检测的 OD 值低,表明抑制率高;反之,当待测氰戊菊酯浓度低时,则所测的 OD 值高,抑制率低。根据用已知的氰戊菊酯浓度检测所作的标准曲线,可以推算出待测氰戊菊酯的浓度。

[0016] (三) 有益效果

[0017] 本发明的优点是能准确灵敏地检测不同来源的水样中氰戊菊酯残留,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。本发明对解决大批量样品的氰戊菊酯残留现场监控技术具有重要的现实意义。

具体实施方式

[0018] 下面实施例用于进一步说明本发明,但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。

[0019] 实施例 1 试剂盒操作及结果计算

[0020] 试剂盒操作及结果计算:待测样品经前处理后,用含甲醇 50% 的 PBS 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。配制 0mg/L,0.05mg/L,0.5mg/L,5mg/L,50mg/L,100mg/L,200mg/L 的氰戊菊酯标准液,加入 50 μL 标样或处理好的样品到各孔中,标样和样品做 2 ~ 4 个重复,加入 50 μL 稀释的抗体,37℃ 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 μL ,37℃ 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 μL ,在暗处显色 10 ~ 15 分钟,每孔加入 50 μL 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。

[0021] 将含 0 标准液孔的 OD 值减去含最大浓度标准液孔的 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 $\log$ 值为横坐标,绘制氰戊菊酯标准抑制曲线。其中,曲线回归方程为 $y = -0.30x + 1.71$, $R^2 = 0.98$,抑制中浓度 $\text{IC}_{50} = 10.7\text{mg/L}$,最低检测限 $\text{IC}_{20} = 1.0\text{mg/L}$ 。

[0022] 实施例 2 3-[(±) 氰基 [(CIS) 2-[3- 氯苯基] 3- 甲基丁羰基氧基] 苯氧基] 苯丙

酸的合成

[0023] 1-溴-3-(二甲氧基甲基)苯的合成

[0024] 将 18.5g (0.1mol) 3-溴苯甲醛, 置于 100mL 的三口瓶中, 加入 5mL 甲醇, 室温下搅拌约 2min, 再向体系内滴加 12.2g (0.118mol) 原酸三甲酯和 10mL 甲醇的混合溶液, 待搅拌均匀后滴入 2 滴浓硫酸, 此时体系略微放热。室温下搅拌, TLC 监测反应进度。待反应进行完全后, 用 40mL 乙醚稀释反应体系, 再用 10mL 5% 的 Na_2CO_3 水溶液洗涤有机相, 当摇振后有大量白色固体析出, 而且有机相和水相的界面不清晰, 加入 30mL 去离子水洗涤有机相, 再用 10mL 去离子水洗涤, 分出有机相, 用无水 MgSO_4 干燥。减压蒸馏, 在 0.5mmHg 下收集 99 ~ 101℃ 的馏分。得无色粘稠液体, 约 16.16g, 产率: 70.3%。

[0025] 4-羟基苯丙酸苯甲酯的制备

[0026] 16.6g (0.1mol) 对羟基苯丙酸, 和 32mL (0.3mol) 苄醇, 置于 100mL 单口烧瓶中, 加入 50mL 无水甲苯, 室温下搅拌均匀, 再滴入 5 滴 85% 的 H_3PO_4 , 加热会馏分水, 反应约 12 小时, 此时体系呈黄色澄清, 共分出约 0.7mL 水, 停止反应, 待体系恢复至室温, 向体系内加入 50mL 乙酸乙酯, 稀释反应体系, 再用 25mL 饱和的 NaHCO_3 水溶液分 2 两次洗涤有机相, 再用去离子水洗涤有机相 3 次, 每次 10mL, 分出有机相用无水 MgSO_4 干燥。减压蒸馏, 在 1mmHg 时收集 216 ~ 217℃ 的馏分。得淡黄色粘稠状液体 20.68g, 产率约为 80.7%

[0027] 4-(3-二甲氧基甲基)苯氧基苯丙酸苯甲酯的制备

[0028] 称 20.68g (0.08mol) 4-羟基苯丙酸苯甲酯置于 250mL 的三口烧瓶中, 用 120mL 无水 DMF 溶解, 体系内通入 N_2 气后搅拌; 再称 3.9g 50% 的 NaH 分批快速加入烧瓶中, 此时体系内立即出现浅黄色浊状物, 随后黄色随 NaH 的加入不断变深, 而且有气泡 (泡沫) 产生, 体系温度上升约 10℃; 加完 NaH, 搅拌约 20min, 待体系颜色变成棕黄色时, 再向烧瓶中加入 18.6g (0.08mol) I₂ 和 50mL 无水吡啶, 再在搅拌下加入 0.87g CuCl 和 0.44g Cu 屑, 此时体系立刻变成深棕色; 投料完毕后升温至回流, TLC 监测反应进度; 待原料反应完全后, 停止加热, 让体系恢复至室温; 用 1500mL 乙酸乙酯稀释反应体系, 此时立即有大量棕色凝胶状不溶物析出, 抽滤将滤液分出, 用乙酸乙酯洗涤不溶物, 将洗液和滤液合并, 制成 4-(3-二甲氧基甲基)苯氧基苯丙酸苯甲酯的乙酸乙酯溶液。

[0029] 4-(3-甲醛苯氧基)苯丙酸苯甲酯的制备

[0030] 用 200mL 10% 的稀盐酸与 2000mL 4-(3-二甲氧基甲基)苯氧基苯丙酸苯甲酯的乙酸乙酯溶液混合搅拌, TLC 监测, 待 4-(3-二甲氧基甲基)苯氧基苯丙酸苯甲酯的点消失后, 用去离子水洗涤有机相至有机相呈中性为止, 用无水 MgSO_4 干燥。将有机相浓缩后柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯 = 5 : 1) 得黄色粘稠油状液体约 10g, 产率为: 30.8%。

[0031] 3-[3-[氰基(羟基)甲基]苯氧基]苯丙酸苯甲酯的制备

[0032] 将 0.85g (13mmol) KCN 溶于 3mL 去离子水中, 置于冰水浴中冷却; 将 0.9g (2.5mmol) 4-(3-甲醛苯氧基)苯丙酸苯甲酯的 15mL THF 溶液加入 KCN 水溶液中, 搅拌至体系的温度为 0℃ 左右; 用滴液漏斗向体系内缓慢滴加 40% H_2SO_4 , 冰水浴下搅拌反应, TLC 监测反应进度, 待 4-(3-甲醛苯氧基)苯丙酸苯甲酯的点消失后停止搅拌, 用 30mL 二氯甲烷稀释反应体系, 再用去离子水洗涤有机相 3 次, 每次 15mL, 分出有机相, 用无水 MgSO_4 干燥。旋转蒸发仪上减压蒸出溶剂, 得黄色粘稠油状液体约 0.93g, 产率为: 96%。

[0033] S-氰戊菊酸的制备

[0034] 取 100g 外消旋的氰戊菊酸加入 200mL 的甲苯和 300mL 的甲醇, 搅拌加热至回流。然后停止加热, 加入 42g 的 (S)-(-)- α -甲基苄胺 (约 30min 加完), 停止反应, 反应液室温冷却, 过滤收集固体, 并用甲醇冲洗固体三次。将所收集的固体加入 400mL 甲醇, 加热回流 1h, 然后室温冷却, 过滤收集固体。然后在 2000mL 甲醇中重结晶收集到的固体。收集到的固体加入 300mL 3mol/L 的 HCl, 然后加入 500mL 的二乙醚抽提酸化的 S- 氰戊菊酸, 分液收集有机相, 旋转蒸发脱去溶剂得白色固体 33.2g, 熔点为 103.3-106.3℃。[α]_{D20}°C = 36.7 [C = 1, CH₃CH₂OH] e. e. = 95.7%

[0035] 手性拆分检测色谱条件: Agilent 6890, 色谱柱: HP530m, 载气: N₂, 流速: 2.0mL/min。

[0036] 气化室升温程序: 70℃ 保持 1min, 15℃/min 升温至 280℃

[0037] S- 氰戊菊酰氯的制备

[0038] 将 0.53g (2.5mmol) (S)- 菊酸溶于 5mL 无水二氯甲烷, 置于冰盐浴中冷却至 0℃ 左右, 搅拌下用滴管移入 0.55mL (7.5mmol) SOCl₂ 和 1mL 无水二氯甲烷的混合溶液, 滴加完毕, 让体系在冰盐浴中搅拌 10min, 再撤去冰盐浴, 升温至回流反应 3 小时, 体系由无色逐渐变成黄色, 反应完毕, 用旋转蒸发仪减压蒸除溶剂和过量的 SOCl₂, 得粗酰氯, 封口干燥放置。

[0039] 3-[(±) 氰基 [(CIS) 2-[3- 氯苯基] 3- 甲基丁羰基氧基] 苯氧基] 苯丙酸苯甲酯的制备

[0040] 把 1.5g (3.87mmol) 3-[3-[氰基 (羟基) 甲基] 苯氧基] 苯丙酸苯甲酯溶于 10mL 无水二氯甲烷中, 冰盐浴下冷却至 0℃, 再在搅拌下滴加 0.8g (3.46mmol) 粗 (S)- 菊酰氯和 2mL 无水二氯甲烷的混合溶液, 滴加完毕立即加入 1mL 无水吡啶, 此时体系内立即产生大量白色雾状物, 冰盐浴下搅拌 10min, 再撤去冰浴, 将体系置于室温中搅拌反应, 体系呈黄色澄清, TLC 监测反应进度, 待反应完全, 停止搅拌, 用 25mL 二氯甲烷稀释反应体系, 用 10mL 稀盐酸洗涤有机相, 再用去离子水洗涤有机相至中性, 分出有机相, 用无水 MgSO₄ 干燥; 将有机相用旋转蒸发仪减压蒸除溶剂, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯 = 5 : 1) 得黄色粘稠油状液体 1.58g, 产率为 78.4%。

[0041] ¹H NMR (CDCl₃) 图谱显示该化合物为两种光学异构体的混合物, δ 0.71 (dd, 3H, CH₃), 1.00 (dd, 3H, CH₃), 2.32 (m, 1H, Me₂CH), 2.69 (t, 2H, CH₂), 2.97 (t, 2H, CH₂), 3.22 [dd, 1H, CHC(O)], 5.12 (s, 2H, CH₂Ar), 6.30 (d, 1H, CHCN), 6.86-7.35 (m, 17H, Ar)。

[0042] 3-[(±) 氰基 [(CIS) 2-[3- 氯苯基] 3- 甲基丁羰基氧基] 苯氧基] 苯丙酸的制备

[0043] 在氮气保护下, 将 0.79g (1.35mmol) 3-[(±) 氰基 [(CIS) 2-[3- 氯苯基] 3- 甲基丁羰基氧基] 苯氧基] 苯丙酸苯甲酯用 8mL 无水二氯甲烷溶解, 加入 0.24mL (1.68mmol) 三甲基碘硅烷, 35℃ 反应约 1 小时, 用 30mL 二氯甲烷稀释反应体系, 再用去离子水洗涤有机相 3 次, 每次 10mL, 分出有机相用无水 MgSO₄ 干燥, 将有机相旋转蒸发仪减压蒸除溶剂, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯 = 3 : 1, 含 2.5% 乙酸) 得淡黄色粘稠液体约 0.5g, 产率为: 75%。

[0044] ¹H NMR (CDCl₃) 图谱显示该化合物为两种光学异构体的混合物, δ 0.70 (dd, 3H, CH₃), 1.00 (dd, 3H, CH₃), 2.31 (m, 1H, Me₂CH), 2.69 (t, 2H, CH₂), 2.95 (t, 2H, CH₂), 3.24 [dd, 1H, CHC(O)], 6.32 (d, 1H, CHCN), 6.89-7.35 (m, 12H, Ar)。LC-MSD-Trap-VL m/z [M+Na]⁺ = C₂₈H₂₆C₁NNaO₅ 理论值: 514.1, 实测值: 514.1。

[0045] 实施例 3 氰戊菊酯多克隆抗体制备

[0046] 以活性酯法将半抗原与牛血清白蛋白偶联,称 2mg 偶联物溶于 1mL 生理盐水中,和 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,用 35% 的饱和硫酸铵盐析法粗提兔抗血清,最后用 DE-52 阴离子交换层析法进一步纯化,获得较纯的氰戊菊酯多克隆抗体。

[0047] DE-52 阴离子交换纯化抗体:

[0048] (1)DE-52 预处理:以 1mg 粗 IgG 需 5g 湿重纤维素计算,称适量 DE-52 加 0.5mol/L NaOH 浸泡 30min,蒸馏水反复洗至中性;接着用 0.5mol/L HCl 浸泡 30min,蒸馏水反复洗至中性;再用 0.5mol/L NaOH 浸泡 30min,蒸馏水反复洗至中性,最后用 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 充分平衡过夜。

[0049] (2)装柱:装柱前用真空泵抽去 DE-52 溶液中的气泡,装柱过程中不能产生气泡,上样前柱床用 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 平衡。

[0050] (3)上样:用 4~6mL 的 PBS 将适量的粗 IgG 稀释,然后沿柱臂缓慢加在柱床上表面,待样品进入柱床后开始洗脱。

[0051] (4)洗脱:以 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 作洗脱液,流速 0.5mL/min,收集第一和第二吸收峰。

[0052] (5)收集液冷冻干燥,4℃ 保存。

[0053] 实施例 4 酶标板的制备

[0054] 用包被缓冲液(0.05M pH 9.6 碳酸钠缓冲液)将氰戊菊酯抗原稀释成 1 μg/mL,每孔加入 100 μL,37℃ 温育 2h 并 4℃ 过夜,倾去包被液,用洗涤液洗涤 3 次,每次 30 秒,拍干,然后在每孔中加入 150-200 μL 封闭液,37℃ 温育 2h,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0055] 实施例 5 氰戊菊酯残留分析酶联免疫吸附检测试剂盒的组建

[0056] 本例中,试剂盒包含如下部分:

[0057] (1)包被氰戊菊酯抗原的酶标板

[0058] (2)海绵支架

[0059] (3)氰戊菊酯标准品

[0060] (4)氰戊菊酯多克隆抗体

[0061] (5)辣根过氧化物酶标羊抗兔抗体

[0062] (6)浓缩洗涤液配方为:氯化钠 8g、磷酸二氢钾 0.2g、磷酸氢二钠 3g、氯化钾 5g、吐温-20 2mL、蒸馏水 20mL。

[0063] (7)显色液 A 液配方:过氧化脲 1g,10.3g 柠檬酸,35.8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,吐温-20 100 μL,蒸馏水 1000mL, pH5。

[0064] (8)显色液 B 液配方:四甲基联苯胺(TMB)700mg(40mL DMSO 溶解),10.3g 柠檬酸,蒸馏水 1000mL, pH2.5。

[0065] 实施例 6 试剂盒特异性实验

[0066] 选择常用 II 型菊酯类农药甲氰菊酯(fenpropathrin)、溴氰菊酯(deltamethrin)、氟胺氰菊酯(fluralinate)、氯氰菊酯(cypermethrin)和功夫菊酯(cyhalothrin)、为待测

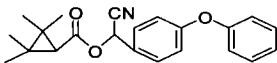
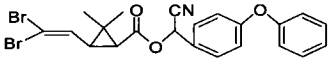
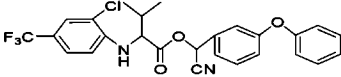
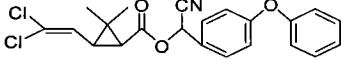
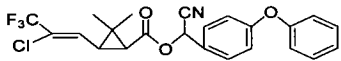
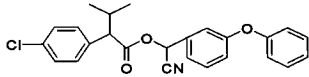
物,测得各种物质的抑制中浓度 (IC_{50}),再用下式计算抗体对这些物质的交叉反应性;交叉反应率愈小,则抗体对氰戊菊酯的特异性愈强,反之则抗体的特异性差。

[0067] 交叉反应 ($CR\%$) = $IC_{50}(\text{氰戊菊酯})/IC_{50}(\text{供试物}) \times 100\%$ 。

[0068] 实验测定结果见表1,采用间接ELISA法,多克隆抗体对常用II型菊酯类农药的交叉反应均小于3%,说明该试剂盒的特异性好,可保证对样品中氰戊菊酯残留测定结果的可靠性。

[0069] 表1 交叉反应

[0070] Tab 1 Cross Reactivities of Indirect ELISA Kit

被测物	结构式	交叉反应率
Analytes	Structure	Cross-reactivity (%)
甲氰菊酯 fenpropathrin		< 0.1
溴氰菊酯 deltmethrin		2.5
氟胺氰菊酯 fluvalinate		ni
氯氰菊酯 cypermethrin		2.5
功夫菊酯 cyhalothrin		ni
氰戊菊酯 fenvelerate		100

[0072] ni :所用被测物浓度为 10mg/L 时,抑制率小于 10%

[0073] 实施例 7 回收试验

[0074] 供试的自来水与井水水样采自中国农业大学西校区,河水水样采自北京市小清河。添加氰戊菊酯的来源不同的水样进行不同的前处理后进行酶联免疫测定分析,结果见表 2。

[0075] 表 2 水样中氰戊菊酯的添加回收率

[0076] Table 2 Recovery of fenvelerate from the spiked water samples by pretreatment

[0077]

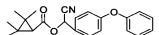
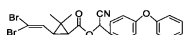
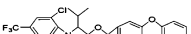
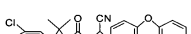
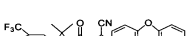
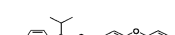
样品 Analyte (n = 4)	添加量 Spiked (ppm)	实际测定值 Measured (ppm) (mean ± S. E.)	回收率 Recovery (mean ± S. E.) %
--------------------------	------------------------	---	--------------------------------------

自来水 Tap water	1	0.98 ± 0.02	98 ± 2
	5	4.9 ± 0.5	98 ± 10
	10	9.8 ± 0.2	98 ± 2
井水 Well water	1	0.95 ± 0.04	95 ± 4
	5	4.8 ± 0.2	97 ± 4
	10	9.8 ± 0.25	98 ± 2.5
河水 River water	1	1.08 ± 0.08	108 ± 8
	5	5.2 ± 0.3	103 ± 6
	10	10.3 ± 0.35	103 ± 3.5

专利名称(译)	氰戊菊酯残留的间接竞争酶联免疫吸附分析试剂盒		
公开(公告)号	CN101526524B	公开(公告)日	2013-01-23
申请号	CN200810101542.2	申请日	2008-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	许艇 李季 高宏斌		
发明人	许艇 李季 高宏斌		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
代理人(译)	王朋飞		
其他公开文献	CN101526524A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种适用于氰戊菊酯残留检测的酶联免疫吸附分析试剂盒，包括包被氰戊菊酯抗原的酶标板、浓缩洗涤液、氰戊菊酯标准品、氰戊菊酯特异性抗体、酶标记物、底物显色液和反应终止液。本发明的优点是能准确灵敏地检测水中氰戊菊酯残留，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。

被测物	结构式	交叉反应率
Analytes	Structure	Cross-reactivity (%)
甲氧菊酯 fenpropathrin		< 0.1
溴氰菊酯 deltamethrin		2.5
氟胺氰菊酯 fluvalinate		ni
氯氰菊酯 cypermethrin		2.5
功夫菊酯 cyhalothrin		ni
氰戊菊酯 fenvelerate		100