

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810101544.1

[43] 公开日 2009年9月9日

[11] 公开号 CN 101526526A

[22] 申请日 2008.3.7

[21] 申请号 200810101544.1

[71] 申请人 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 李季 许艇 高宏斌

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

代理人 王朋飞

权利要求书2页 说明书9页 附图1页

[54] 发明名称

功夫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功夫菊酯残留检测的酶联免疫吸附分析试剂盒，包括包被功夫菊酯抗原的酶标板、浓缩洗涤液、功夫菊酯标准品、功夫菊酯特异性抗体、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功夫菊酯残留，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. 一种检测功夫菊酯残留的酶联免疫吸附分析试剂盒，包括包被功夫菊酯抗原的酶标板、浓缩洗涤液、功夫菊酯标准品、功夫菊酯特异性抗体、酶标记物、底物显色液和反应终止液。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒，其特征在于制备功夫菊酯特异性抗体的免疫原为 3-[(±)氰基[(±)-(顺式)-3-[(Z型)-3-氯-4,4,4-三氟-1-乙基-2,2-二甲基]-环丙基 羰基氧基]苯氧基]苯丙酸与载体蛋白的偶联复合物。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒，其特征在于所述功夫菊酯抗原为 3-[(±)氰基[(±)-(顺式)-3-[(Z型)-3-氯-4,4,4-三氟-1-乙基-2,2-二甲基]-环丙基 羰基氧基]苯氧基]苯丙酸与载体蛋白的偶联复合物。

4. 根据权利要求1或2所述的试剂盒，其特征在于所述酶标记物为酶标记二抗。

5. 根据权利要求1或2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-20 0.5~3mL。

6. 根据权利要求1或2所述的试剂盒，其特征在于，当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。

7. 根据权利要求6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, pH2.4-2.6。

8. 权利要求 1~7 任一项所述试剂盒在检测功夫菊酯残留中的应用。

功夫菊酯残留的间接竞争酶联免疫吸附分析试剂盒

技术领域

本发明涉及一种功夫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功夫菊酯残留的快速测定。

背景技术

功夫菊酯是一种合成菊酯类农药，广泛的应用于农作物与畜舍的害虫杀灭与预防。在我国，功夫菊酯主要用于棉花、茶叶、果树和蔬菜种植中。然而，功夫菊酯是一种高毒物质，对于大鼠和小鼠的经口半数致死量（ LC_{50} ）分别为 79mg/Kg 和 56mg/Kg，而对于鱼类（ $LC_{50}=0.078-2.3\mu\text{g/L}$ ）和水生的无脊椎动物（ $LC_{50}=0.0023-3.3\mu\text{g/L}$ ）的毒性更高。而且，功夫菊酯在环境中的残留时间也比较长，它在土壤、植物和脂肪组织中的半衰期分别为 30、40 和 23 天。并且有研究显示功夫菊酯可以在鱼类的体内累积，从而有可能影响人类的健康。

常用的功夫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、食品等样品中痕量功夫菊酯残留进行分析，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

（一）要解决的技术问题

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功夫菊酯残留的间接竞争酶联免疫吸附分析试剂盒。

(二) 技术方案

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

其中，所述包被抗原是 3-[(±)氰基[(±)-(顺式)-3-[(Z型)-3-氯-4,4,4-三氟-1-乙基-2,2-二甲基]-环丙基 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。

其中所述功夫菊酯特异性抗体是由 3-[(±)氰基[(±)-(顺式)-3-[(Z型)-3-氯-4,4,4-三氟-1-乙基-2,2-二甲基]-环丙基 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。

其中，包被抗原的酶标板的制备过程中，所用包被液可以是 0.05 M 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。

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。

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。

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。

本发明试剂盒的分析原理是:

当酶标板预包被抗原时,加入待测功夫菊酯样品和多克隆抗体,固相包被抗原和待测功夫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,所以当待测的功夫菊酯浓度高时,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,当待测功夫菊酯浓度低时,则所测的 OD 值高,抑制率低。根据用已知的功夫菊酯浓度检测所作的标准曲线,可以推算出待测功夫菊酯的浓度。

(三) 有益效果

本发明的优点是能准确灵敏地检测不同来源的水样中功夫菊酯残留,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功夫菊酯残留现场监控技术具有重要的现实意义。

附图说明

图 1 功夫菊酯的标准抑制曲线。

具体实施方式

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。

实施例 1 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 0ng/mL，5 ng/mL，10 ng/mL，100 ng/mL，1000 ng/mL，10000 ng/mL 的功夫菊酯标准液，加入 50 μ L 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 μ L 稀释的抗体，37 $^{\circ}$ 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 μ L，37 $^{\circ}$ 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 μ L，在暗处显色 10~15 分钟，每孔加入 50 μ 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 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，绘制功夫菊酯标准抑制曲线(附图 1)。其中，曲线回归方程为 $Y = -0.448X + 1.201$ ， $R^2 = 0.993$ ，抑制中浓度 $IC_{50} = 37\mu\text{g/L}$ ，最低检测限 $IC_{10} = 4.7\mu\text{g/L}$ 。

实施例 2 半抗原 3-[(\pm)氟基[(\pm)-(cis)-3-[(Z)-3-氯-4,4,4-三氟-1-乙基-2,2-二甲基]环丙基羰基氧]苯氧基]苯丙酸的合成

4-羟基苯丙酸苯甲酯的合成

250 mL 三口瓶中加入 14.4g 对羟基苯丙酸,27mL 苄醇,15mL 甲苯,滴入 4 滴 85%的 H_3PO_4 ,回流,分水,反应需 10 h。蒸馏除去过量甲苯,减压蒸去苄醇,残余物溶于乙醚中,分别用饱和 $NaHCO_3$ 溶液、水洗涤三次。无水 $MgSO_4$ 干燥,蒸去低沸物,减压蒸馏。收集 234-236 $^{\circ}$ C (4mm Hg) 馏分,得无色粘液 4-羟基苯丙酸苯甲酯 16.1g,收率 72.5%。

1-溴-3-(二甲氧基甲基)苯的合成

18.5g 间溴苯甲醛, 12.2g 甲酸三甲酯, 15mL 甲醇于 250mL 三口瓶中, 滴入 2 滴浓 H_2SO_4 , 常温搅拌 3h。混合物用乙醚稀释, 分别用饱和 Na_2CO_3 溶液、水洗涤三次。无水 $MgSO_4$ 干燥, 蒸去低沸物, 减压蒸馏。收集 102-104 $^{\circ}C$ (6mm Hg) 馏分, 得无色液体 1-溴-3-(二甲氧基甲基)苯 13.5g, 收率 57.9%。

4-(3-甲醛苯氧基)苯丙酸苯甲酯的合成

100mL 三口瓶中, 加入 5.0g 4-羟基苯丙酸苯甲酯, 30mL 无水 DFM, 冰浴到 5 $^{\circ}C$ 以下, 分批加入 NaH (50%) 1.0g, 加完后撤去冰浴, 加入 2.7g 1-溴-3-(二甲氧基甲基)苯, 1.8g Cu_2Cl_2 , 0.9g 铜粉, 4.8 mL 吡啶, 回流反应 8h, 停止反应, 冷却, 用 150mL 乙酸乙酯稀释, 用 10% HCl 洗涤三次, 加入 10% HCl 10mL 振荡 2h, 水洗三次, 分出有机层, 干燥, 脱溶, 柱层析, 得 4-(3-甲醛苯氧基)苯丙酸苯甲酯 1.27g, 收率 30.2%。

3-[3-[氰基(羟基)甲基]苯氧基]苯丙酸苯甲酯的合成

50 mL 三口瓶中, 加入 1.5g KCN , 4mL 水, 搅拌溶解, 冰浴到 5 $^{\circ}C$ 以下。加入 4-(3-甲醛苯氧基)苯丙酸苯甲酯 1.27 g, THF(四氢呋喃)16mL, 缓慢滴加 40% H_2SO_4 4mL。滴完后, 5 $^{\circ}C$ 以下反应 30 min。停止反应, 用乙醚萃取三次, 合并有机层, 干燥, 脱溶, 得 3-[3-[氰基(羟基)甲基]苯氧基]苯丙酸苯甲酯 1.05g, 收率 76.6%。

3-[(±)氰基[(±)-(cis)-3-[(Z)-3-氯-4,4,4-三氟-1-乙基-2,2-二甲基]环丙基羰基氧]苯氧基]苯丙酸苯甲酯的合成

50mL 三口瓶中, 加入 2.38g 3-[3-[氰基(羟基)甲基]苯氧基]苯丙酸苯甲酯, 15 mL CH_2Cl_2 , 1.34g 功夫菊酸((±)-(cis)-3-[(Z)-3-氯-4,4,4-三氟-1-乙基-2,2-二甲基]环丙基甲酸), 冰浴下滴加溶有 1.26g DCC 的 15 mL CH_2Cl_2 , 滴加完毕后停止反应。脱溶, 柱层析得 3-[(±)氰基[(±)-(cis)-3-[(Z)-3-氯-4,4,4-三氟-1-乙基-2,2-二甲基]环丙基羰基氧]

苯氧基]苯丙酸苯甲酯(Cwb-5) 2.54g, 收率 75.1%。

3-[(±)氰基[(±)-(cis)-3-[(Z)-3-氯-4,4,4-三氟-1-乙基-2,2-二甲基]环丙基羰基氧]苯氧基]苯丙酸的合成

50mL 三口瓶中, 加入 2.38g 3-[(±)氰基[(±)-(cis)-3-[(Z)-3-氯-4,4,4-三氟-1-乙基-2,2-二甲基]环丙基羰基氧]苯氧基]苯丙酸苯甲酯, CH_2Cl_2 10 mL, Me_3SiZ 0.4 mL, N_2 保护下, 35°C 反应 2h。大板层析分离得 3-[(±)氰基[(±)-(cis)-3-[(Z)-3-氯-4,4,4-三氟-1-乙基-2,2-二甲基]环丙基羰基氧]苯氧基]苯丙酸 0.93g, 收率 76.2%。

实施例 3 功夫菊酯多克隆抗体制备

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, 获得较纯的功夫菊酯多克隆抗体。

DE-52 阴离子交换纯化抗体:

(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。

(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。

(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。

(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。

(5) 收集液冷冻干燥, 4℃保存。

实施例 4 酶标板的制备

用包被缓冲液 (0.05 M pH 9.6 碳酸钠缓冲液) 将功夫菊酯抗原稀释成 1μg/mL, 每孔加入 100μL, 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 150-200μL 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。

实施例 5 功夫菊酯残留分析酶联免疫吸附检测试剂盒的组建

本例中, 试剂盒包含如下部分:

(1) 包被了功夫菊酯抗原的酶标板

(2) 海绵支架

(3) 功夫菊酯标准品

(4) 功夫菊酯多克隆抗体

(5) 辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体

(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 20 mL。

(7) 显色液 A 液配方: 过氧化脲 1g, 10.3g 柠檬酸, 35.8g Na₂HPO₄·12 H₂O, 吐温-20 100μL, 蒸馏水 1000 mL, pH5。

(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 1000 mL, pH2.5。

实施例 6 试剂盒特异性实验

选择常用 II 型菊酯类农药氰戊菊酯 (fenvelerate)、甲氰菊酯 (fenpropathrin)、溴氰菊酯 (deltmethrin)、氟胺氰菊酯 (fluvalinate) 和氯氰菊酯 (cypermethrin) 为待测物, 测得各种物质的抑制中浓度 (IC₅₀), 再用下式计算抗体对这些物质的交叉反应性; 交叉反应率

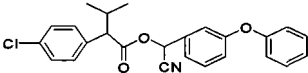
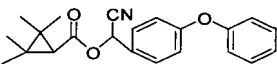
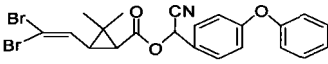
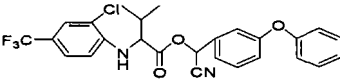
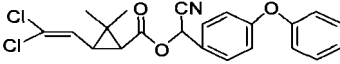
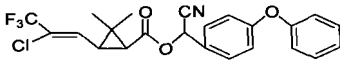
愈小，则抗体对功夫菊酯的特异性愈强，反之则抗体的特异性差。

交叉反应 (CR%) = $IC_{50}(\text{功夫菊酯}) / IC_{50}(\text{供试物}) \times 100\%$ 。

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，可保证对样品中功夫菊酯残留测定结果的可靠性。

表 1 交叉反应

Tab 1 Cross Reactivities of Indirect ELISA Kit

被测物	结构式	交叉反应率
Analytes	Structure	Cross-reactivity (%)
氟戊菊酯 fenvelerate		ni
甲氰菊酯 fenpropathrin		< 0.05
溴氰菊酯 deltmethrin		ni
氟胺氰菊酯 fluvalinate		ni
氯氰菊酯 cypermethrin		2.5
功夫菊酯 cyhalothrin		100

ni: 所用被测物浓度为 10mg/L 时，抑制率小于 10%

实施例 7 回收试验

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。添加功夫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。

表 2 水样中功夫菊酯的添加回收率

Table 2 Recovery of cyhalothrin from the spiked water samples by pretreatment

样品 Analyte (n=4)	添加量 Spiked (ppm)	理论测定值 Theoretical (ppb)	实际测定值 Measured(ppb) (mean ± S.E.)	回收率 Recovery (mean ± S.E.) %
自来水 Tap water	0.05	5	4.75 ± 0.3	95 ± 6
	0.2	20	19.6 ± 1.6	98 ± 8
	0.5	50	48.5 ± 2.0	97 ± 4
井水 Well water	0.05	5	5 ± 0.4	100 ± 8
	0.2	20	19.6 ± 2.2	98 ± 11
	0.5	50	48.5 ± 1.5	97 ± 3
河水 River water	0.25	5	5.7 ± 0.25	114 ± 5
	1	20	21.6 ± 1.0	108 ± 5
	2.5	50	55.5 ± 3.5	111 ± 7

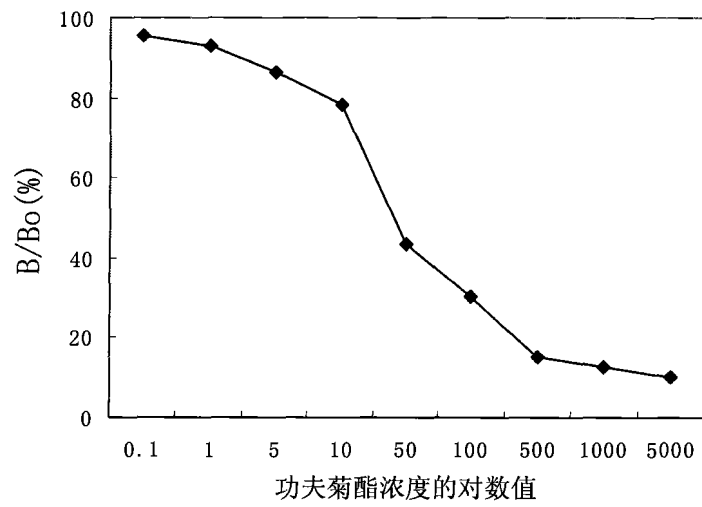


图 1

专利名称(译)	功夫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	CN101526526A	公开(公告)日	2009-09-09
申请号	CN200810101544.1	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	李季 许艇 高宏斌		
发明人	李季 许艇 高宏斌		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
代理人(译)	王朋飞		
其他公开文献	CN101526526B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种适用于功夫菊酯残留检测的酶联免疫吸附分析试剂盒，包括包被功夫菊酯抗原的酶标板、浓缩洗涤液、功夫菊酯标准品、功夫菊酯特异性抗体、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功夫菊酯残留，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 (%)
氟戊菊酯 fenvelerate		ni
甲氰菊酯 fenpropathrin		< 0.05
溴氰菊酯 deltmethrin		ni
氟胺菊酯 fluvalinate		ni
氯氰菊酯 cypermethrin		2.5
功夫菊酯 cyhalothrin		100