



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106543284 A

(43)申请公布日 2017.03.29

(21)申请号 201610980250.5

(22)申请日 2016.11.08

(71)申请人 佛山市飞时达新材料科技有限公司

地址 528531 广东省佛山市高明区荷城街
道江湾路78号403室

(72)发明人 叶青

(74)专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理
有限公司 11246

代理人 连围

(51) Int. Cl.

C07K 16/06(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页

(54)发明名称

一种丁烯磷、百治磷和氧乐果抗体的制备方法及应用

(57)摘要

本发明公开了一种丁烯磷、百治磷和氧乐果三种农药抗体的制备方法及应用,通过制备通用半抗原,采用活性酯法使半抗原偶联牛血清蛋白(BSA)制备免疫原,采用混合酸酐法使半抗原偶联钥孔血蓝蛋白(KLH)制备包被原,将免疫原免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体,基于该抗体建立的酶联免疫分析方法(ELISA)可用于检测丁烯磷、百治磷和氧乐果三种有机磷酸酯类农药,该方法的检测成本低,特异性强,灵敏度高,操作简便,稳定性和重复性好,测定结果可靠,且能在室外进行大批量样品的快速检测。

1. 一种丁烯磷、百治磷和氧乐果抗体,其特征在于:所述丁烯磷、百治磷和氧乐果抗体是通过通用半抗原与牛血清蛋白偶联制备的免疫原免疫4-6月龄的雄性新西兰大白兔得到,所述通用半抗原为0,0-二甲基-0-(4-丙酸基苯基)磷酸酯,所述丁烯磷、百治磷和氧乐果抗体为多克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的丁烯磷、百治磷和氧乐果抗体,其特征在于,所述通用半抗原的制备方法包括以下步骤:

(1) 将对羟基苯丙酸加入甲醇中,使其质量/体积比为3/15,再加入1mL浓硫酸,120℃加热回流2h,之后先蒸出加入体积量1/3的甲醇,加入碳酸钠饱和溶液直到无气体产生,然后用二氯甲烷萃取,萃取液经40℃旋转蒸发除去溶剂,再真空干燥得到红棕色油状的对羟基苯丙酸甲酯;

(2) 以10-15mL乙腈作溶剂,加入步骤(1)得到的对羟基苯丙酸甲酯和二甲氧基磷酸氯,两者为等摩尔比,并加入3g碳酸钾,常温下磁力搅拌2h,反应过程中用薄层层析监测反应进度,直到二甲氧基磷酸氯完全反应,然后静置溶液至完全分层后,取上层液体经0.5μm滤膜过滤,得到的澄清液体经50℃旋转蒸发除去溶剂,得黄色油状物,再经硅胶柱色谱分离得到二甲氧基磷酸酯;

(3) 以20mL乙醇作溶剂,加入步骤(2)得到的二甲氧基磷酸酯,然后加入8mL浓度为1M的氢氧化钾,室温下搅拌50min,然后用浓度为1M的盐酸酸化,再用乙酸乙酯来萃取,萃取液经50℃旋转蒸发除去溶剂,得浅黄色油状物,再经硅胶柱色谱分离,得到最终目标产物0,0-二甲基-0-(4-丙酸基苯基)磷酸酯。

3. 根据权利要求1所述的丁烯磷、百治磷和氧乐果抗体,其特征在于,所述免疫原的制备采用活性酯法,包括以下步骤:

(1) 将50-100μmol的通用半抗原溶解在1-2mL的N,N-二甲基甲酰胺中,然后加入等摩尔比的二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,在室温下搅拌反应20h后,将反应液6000rpm离心8min,得到活性酯上清液;

(2) 称取100mg牛血清蛋白溶于10mL浓度为0.05mol/L碳酸盐缓冲溶液中,4℃磁力搅拌下,以1滴/min的速度滴入步骤(1)得到的活性酯上清液,继续搅拌反应4h,待反应完成后,反应液装入透析袋,用PBS透析72h,其中,PBS的浓度为0.01mol/L,pH为7.4,中间换液3次,得到的产物以6000rpm离心8min,弃沉淀,取上清液,得到免疫原,将免疫原保存于-20℃冰箱中待用。

4. 根据权利要求1所述的丁烯磷、百治磷和氧乐果抗体,其特征在于,所述的抗体为多克隆抗体,其制备方法包括以下步骤:

(1) 选取4-6月龄的雄性新西兰大白兔进行初次免疫,免疫剂量为1.0mg/kg,免疫原用生理盐水稀释,加入等体积弗氏完全佐剂,乳化后,进行背部多点皮内注射;

(2) 三周后,进行加强免疫,免疫剂量为1.0mg/kg,加入等体积弗氏不完全佐剂,背部多点皮下注射,以后每三周按同样的剂量和方法免疫一次;

(3) 第4次免疫一周后,从兔子的耳缘静脉采血,分离抗血清;

(4) 抗血清采用硫酸铵沉淀法纯化得到多克隆抗体,透析后冷冻干燥成粉末,于-20℃下保存备用。

5. 一种权利要求1所述的丁烯磷、百治磷和氧乐果抗体在酶联免疫分析方法中的应用,

其特征在于:通过将通用半抗原偶联钥孔血蓝蛋白制备包被原,将免疫原免疫新西兰大白兔制备的多克隆抗体与包被原建立间接竞争ELISA检测方法,方法的建立包括以下步骤:

(1) 以包被原包被酶标板,每孔100 μ L,置于4 $^{\circ}$ C下过夜,取出酶标板恢复至室温,弃去包被液,用PBST洗涤液洗涤3次,每次3min,拍干酶标板;

(2) 将步骤(1)拍干的酶标板用5%脱脂奶粉封闭,每孔200 μ L,于37 $^{\circ}$ C下水浴3h,弃去封闭液,用PBST洗涤液洗涤3次,每次3min,拍干酶标板,放置37 $^{\circ}$ C烘箱烘干备用;

(3) 用PBST洗涤液将丁烯磷、百治磷和氧乐果三种农药配置成系列质量浓度,另设1个PBST空白对照,用PBST将抗体稀释至 10^4 - 10^6 倍,然后使系列质量浓度的农药溶液或PBST空白与抗体等体积混合,于37 $^{\circ}$ C反应30min,得到预孵育液体;

(4) 将步骤(3)制备的预孵育液体加到步骤(2)烘干的酶标板中,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C水浴反应90min,用PBST洗涤液洗涤3次,每次3min,拍干酶标板;

(5) 用PBST将辣根过氧化酶标记的羊抗兔二抗稀释5000倍,每孔100 μ L加入步骤(4)拍干的酶标板中,37 $^{\circ}$ C水浴中温育30min,用PBST洗涤液洗涤3次,每次3min,拍干酶标板;

(6) 将TMB底物溶液加入步骤(5)拍干的酶标板中,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C水浴显色15min,再向每孔中加入50 μ L浓度为10%的硫酸溶液终止反应,于450nm波长下测各孔的吸光值;

(7) 以所获吸光值的平均值计算抑制率,并OriginPro软件制作各个药物的标准曲线,计算药物抑制中浓度、最低检测限和线性范围。

6. 根据权利要求5所述的丁烯磷、百治磷和氧乐果抗体在酶联免疫分析方法中的应用,其特征在于,所述包被原的制备采用混合酸酐法,包括以下步骤:

(1) 将100-200 μ mol的半抗原溶解在2-3mL的N,N-二甲基甲酰胺中,然后加入等摩尔比的正三丁胺和氯甲酸乙酯,在室温下反应2h,得到反应液;

(2) 称取200mg钥孔血蓝蛋白溶于10mL浓度为0.05mol/L碳酸盐缓冲溶液中,4 $^{\circ}$ C磁力搅拌下,以1滴/min的速度滴入步骤(1)得到的反应液,继续搅拌反应3h,待反应完成后,反应液装入透析袋,用PBS透析12h,其中PBS的浓度为0.01mol/L,pH为7.4,中间换液3次,然后在0.01M的磷酸盐缓冲溶液中透析4天,得到包被原,保存于-20 $^{\circ}$ C冰箱中。

一种丁烯磷、百治磷和氧乐果抗体的制备方法及应用

技术领域：

[0001] 本发明属于免疫学技术领域，具体涉及一种丁烯磷、百治磷和氧乐果抗体的制备方法及其在酶联免疫分析方法中的应用。

背景技术：

[0002] 有机磷农药具有广谱、高效、用量小、半衰期短等优点，在我国的农业生产实践中得到了广泛的应用，然而由于这类农药的长期施用，不仅对土壤、水、食品、大气、生态环境造成极其严重的污染和影响，还严重威胁人类的健康和生存，因此该类农药在环境保护和食品安全方面受到了普遍关注。丁烯磷、百治磷和氧乐果属于高度危害类的有机磷酸酯类杀虫剂，被广泛应用于粮食、蔬菜、水果及经济作物上的害虫防治，虽然这三种农药具有杀虫谱广、药效快等优点，但由于其对人与环境的负面影响越来越大，这就使得丁烯磷、百治磷和氧乐果的残留分析检测倍受关注。

[0003] 传统的农药残留分析方法如液相色谱法、气相色谱法和质谱法等都存在样品前处理复杂，仪器设备昂贵，分析费时长，难以满足现场快速监测要求等问题，迫使人们去开发特异性强、灵敏度高、操作简便、安全廉价、测定结果可靠，且能在室外进行大批量样品快速检测的分析技术，而酶联免疫分析方法(ELISA)可以满足这些需求，受到农药残留检测工作者的重视，并以其独特的优势逐渐成为农药残留快速检测的热点。

[0004] ELISA是将抗原、抗体的免疫反应和酶的高效催化反应有机结合而发展起来的一种综合性技术，农药免疫化学分析技术的原理是依靠以上免疫学原理和生物技术手段，首先将目标分析物半抗原与载体蛋白质偶联，制备有效人工抗原，通过免疫动物制备农药小分子分析物特异性抗体，再利用抗原抗体的特异性免疫学反应和酶标记物的放大作用，定量地检测样本中超微量农药小分子分析物。

[0005] 目前农药多残留免疫检测国内研究成果比较少，国内外仅有少量用多克隆抗体和单克隆抗体进行有机磷农药多残留免疫检测的研究报道，而同时检测丁烯磷、百治磷和氧乐果的酶联免疫分析方法尚未见报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术的不足，提供一种丁烯磷、百治磷和氧乐果三种农药的抗体及其制备方法。

[0007] 本发明另一个目的是提供所述抗体在ELISA检测方法中的应用。

[0008] 为解决上述技术问题，本发明采用的技术方案如下：

[0009] 提供丁烯磷、百治磷和氧乐果三种农药的多克隆抗体，通过制备通用半抗原，半抗原偶联牛血清蛋白(BSA)制备免疫原，免疫原免疫4-6月龄的雄性新西兰大白兔制备得到。

[0010] 所述通用半抗原的制备方法包括以下步骤：

[0011] (1) 将对羟基苯丙酸加入甲醇中，使其质量/体积比为3/15，再加入1mL浓硫酸，120℃加热回流2h，之后先蒸出加入体积量1/3的甲醇，加入碳酸钠饱和溶液直到无气体产生；

然后用二氯甲烷萃取,萃取液经40℃旋转蒸发除去溶剂,再真空干燥得到对羟基苯丙酸甲酯的红棕色油状物;

[0012] (2) 以10-15mL乙腈作溶剂,加入步骤(1)得到的对羟基苯丙酸甲酯和二甲氧基磷酸酐,两者为等摩尔比,并加入3g碳酸钾,常温下磁力搅拌2h,反应过程中用薄层层析监测反应进度,直到二甲氧基磷酸酐完全反应;然后静置溶液至完全分层后,取上层液体经0.5 μ m滤膜过滤,得到的澄清液体经50℃旋转蒸发除去溶剂,得黄色油状物,再经硅胶柱色谱分离得到目标产物二甲氧基磷酸酯;

[0013] (3) 以20mL乙醇作溶剂,加入步骤(2)得到的二甲氧基磷酸酯,然后加入8mL浓度为1M的氢氧化钾,室温下搅拌50min,然后用浓度为1M的盐酸酸化,再用乙酸乙酯来萃取,萃取液经50℃旋转蒸发除去溶剂,得浅黄色油状物,再经硅胶柱色谱分离,得到最终目标产物O, O-二甲基-O-(4-丙酸基苯基)磷酸酯。

[0014] 所述免疫原的制备采用活性酯法,包括以下步骤:

[0015] (1) 将50-100 μ mol的通用半抗原溶解在1-2mL的N,N-二甲基甲酰胺中,然后加入等摩尔比的二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,在室温下搅拌反应20h后,将反应液6000rpm离心8min,得到活性酯上清液;

[0016] (2) 称取100mg牛血清蛋白(BSA)溶于10mL浓度为0.05mol/L碳酸盐缓冲溶液中,4℃磁力搅拌下,以1滴/min的速度滴入步骤(1)得到的活性酯上清液,继续搅拌反应4h,待反应完成后,反应液装入透析袋,用PBS(0.01mol/L, pH7.4)透析72h,中间换液3次,得到的产物以6000rpm离心8min,弃沉淀,上清液为免疫原,保存于-20℃冰箱中。

[0017] 所述多克隆抗体的制备方法包括以下步骤:

[0018] (1) 选取4-6月龄的雄性新西兰大白兔进行初次免疫,免疫剂量为1.0mg/kg,免疫原用生理盐水稀释,加入等体积弗氏完全佐剂,乳化后,进行背部多点皮内注射;

[0019] (2) 三周后,进行加强免疫,免疫剂量为1.0mg/kg,加入等体积弗氏不完全佐剂,背部多点皮下注射,以后每三周按同样的剂量和方法免疫一次;

[0020] (3) 第4次免疫一周后,从兔子的耳缘静脉采血,分离抗血清;

[0021] (4) 抗血清采用硫酸铵沉淀法纯化得到多克隆抗体,透析后冷冻干燥成粉末,于-20℃下保存备用。

[0022] 本发明同时提供了所述抗体在丁烯磷、百治磷和氧乐果三种农药ELISA检测方法中的应用,通过将通用半抗原偶联钥孔血蓝蛋白(KLH)制备包被原,将免疫原免疫新西兰大白兔制备的多克隆抗体与包被原建立间接竞争ELISA检测方法,方法的建立具体包括以下步骤:

[0023] (1) 以包被原包被酶标板,每孔100 μ L,置于4℃下过夜,取出酶标板恢复至室温,弃去包被液,用PBST洗涤液洗涤3次,每次3min,拍干酶标板;

[0024] (2) 用5%脱脂奶粉封闭,每孔200 μ L,于37℃下水浴3h,弃去封闭液,用PBST洗涤液洗涤3次,每次3min,拍干酶标板,放置37℃烘箱烘干备用;

[0025] (3) 用PBST洗涤液将丁烯磷、百治磷和氧乐果三种农药配置成系列质量浓度,另设1个PBST空白对照,用PBST将抗体稀释至 10^4 - 10^6 倍,然后使系列质量浓度的农药溶液或空白与抗体等体积混合,于37℃反应30min,得到预孵育液体;

[0026] (4) 将预孵育好的液体加到酶标板中,每孔100 μ L,37℃水浴反应90min,用PBST洗

涤液洗涤3次,每次3min,拍干酶标板;

[0027] (5) 用PBST将辣根过氧化酶标记的羊抗兔二抗稀释5000倍,每孔100 μ L加入酶标板,37 $^{\circ}$ C水浴中温育30min,用PBST洗涤液洗涤3次,每次3min,拍干酶标板;

[0028] (6) 将TMB底物溶液加入酶标板中,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C水浴显色15min,再向每孔中加入50 μ L浓度为10%的硫酸溶液终止反应,于450nm波长下测各孔的吸光值。

[0029] (7) 以所获吸光值的平均值计算抑制率,并OriginPro软件制作各个药物的标准曲线,计算药物抑制中浓度、最低检测限和线性范围。

[0030] 所述包被原的制备采用混合酸酐法,包括以下步骤:

[0031] (1) 将100-200 μ mol的半抗原溶解在2-3mL的N,N-二甲基甲酰胺中,然后加入等摩尔比的正三丁胺和氯甲酸乙酯,在室温下反应2h,得到反应液;

[0032] (2) 称取200mg钥孔血蓝蛋白(KLH)溶于10mL浓度为0.05mol/L碳酸盐缓冲溶液中,4 $^{\circ}$ C磁力搅拌下,以1滴/min的速度滴入步骤(1)得到的反应液,继续搅拌反应3h,待反应完成后,反应液装入透析袋,用PBS(0.01mol/L,pH7.4)透析12h,中间换液3次,然后在0.01M的磷酸盐缓冲溶液中透析4天,得到包被原,保存于-20 $^{\circ}$ C冰箱中。

[0033] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0034] 本发明制备了丁烯磷、百治磷和氧乐果三种农药的多克隆抗体,并基于抗体建立了间接竞争ELISA检测方法,能同时检测丁烯磷、百治磷和氧乐果三种有机磷酸酯类农药,该方法的检测成本低,特异性强,灵敏度高,操作简便,稳定性和重复性好,测定结果可靠,且能在室外进行大批量样品的快速检测。

具体实施方式

[0035] 实施例1:丁烯磷、百治磷和氧乐果三种农药通用半抗原的制备

[0036] 所述通用半抗原的制备,步骤如下:

[0037] (1) 将对羟基苯丙酸加入甲醇中,使其质量/体积比为3/15,再加入1mL浓硫酸,120 $^{\circ}$ C加热回流2h,之后先蒸出5mL甲醇,加入碳酸钠饱和溶液直到无气体产生;然后用20mL二氯甲烷萃取,萃取液经40 $^{\circ}$ C旋转蒸发除去溶剂,再真空干燥得到对羟基苯丙酸甲酯的红棕色油状物;

[0038] (2) 以15mL乙腈作溶剂,加入10mmol的对羟基苯丙酸甲酯和10mmol的二甲氧基磷酰氯,并加入3g碳酸钾,常温下磁力搅拌2h,反应过程中用薄层层析监测反应进度,直到二甲氧基磷酰氯完全反应;然后静置溶液至完全分层后,取上层液体经0.5 μ m滤膜过滤,得到的澄清液体经50 $^{\circ}$ C旋转蒸发除去溶剂,得黄色油状物,再经硅胶柱色谱分离得到目标产物二甲氧基磷酸酯;

[0039] (3) 以20mL乙醇作溶剂,加入步骤(2)得到的二甲氧基磷酸酯,然后加入8mL浓度为1M的氢氧化钾,室温下搅拌50min,然后用浓度为1M的盐酸酸化,再用40mL乙酸乙酯来萃取,萃取液经50 $^{\circ}$ C旋转蒸发除去溶剂,得浅黄色油状物,再经硅胶柱色谱分离,得到最终目标产物O,O-二甲基-O-(4-丙酸基苯基)磷酸酯。

[0040] 实施例2:丁烯磷、百治磷和氧乐果三种农药免疫原的制备

[0041] 采用活性酯法,包括以下步骤:

[0042] (1) 将100 μ mol的通用半抗原溶解在2mL的N,N-二甲基甲酰胺中,然后加入

0.15mmol的二环己基碳二亚胺和0.15mmol的N-羟基琥珀酰亚胺,在室温下搅拌反应20h后,将反应液6000rpm离心8min,得到活性酯上清液;

[0043] (2) 称取100mg牛血清蛋白(BSA)溶于10mL浓度为0.05mol/L碳酸盐缓冲溶液中,4℃磁力搅拌下,以1滴/min的速度滴入步骤(1)得到的活性酯上清液,继续搅拌反应4h,待反应完成后,反应液装入透析袋,用PBS(0.01mol/L,pH7.4)透析72h,中间换液3次,得到的产物以6000rpm离心8min,弃沉淀,上清液为免疫原,保存于-20℃冰箱中。

[0044] 免疫原鉴定:对载体蛋白BSA,半抗原和免疫原进行紫外扫描测定(200~400nm),发现免疫原与BSA和半抗原相比,吸收曲线有明显改变,说明半抗原与BSA偶连成功。三硝基苯磺酸法测得半抗原与BSA的偶连比为15:1。

[0045] 实施例3:丁烯磷、百治磷和氧乐果三种农药包被原的制备

[0046] 采用混合酸酐法,包括以下步骤:

[0047] (1) 将200 μ mol的半抗原溶解在3mL的N,N-二甲基甲酰胺中,然后加入71 μ L的正三丁胺和40 μ L的氯甲酸乙酯,在室温下反应2h,得到反应液;

[0048] (2) 称取200mg钥孔血蓝蛋白(KLH)溶于10mL浓度为0.05mol/L碳酸盐缓冲溶液中,4℃磁力搅拌下,以1滴/min的速度滴入步骤(1)得到的反应液,继续搅拌反应3h,待反应完成后,反应液装入透析袋,用PBS(0.01mol/L,pH7.4)透析12h,中间换液3次,然后在0.01M的磷酸盐缓冲溶液中透析4天,得到包被原,保存于-20℃冰箱中。

[0049] 包被原鉴定:对载体蛋白KLH,半抗原和包被原进行紫外扫描测定(200~400nm),发现包被原与KLH和半抗原相比,吸收曲线有明显改变,说明半抗原与KLH偶连成功。三硝基苯磺酸法测得半抗原与KLH的偶连比为10:1。

[0050] 实施例4:丁烯磷、百治磷和氧乐果三种农药多克隆抗体的制备

[0051] 所述多克隆抗体的制备方法包括以下步骤:

[0052] (1) 选取4~6月龄的雄性新西兰大白兔进行初次免疫,免疫剂量为1.0mg/kg,免疫原用生理盐水稀释,加入等体积弗氏完全佐剂,乳化后,进行背部多点皮内注射;

[0053] (2) 三周后,进行加强免疫,免疫剂量为1.0mg/kg,加入等体积弗氏不完全佐剂,背部多点皮下注射。以后每三周按同样的剂量和方法免疫一次;

[0054] (3) 第4次免疫一周后,从兔子的耳缘静脉采血,分离抗血清;

[0055] (4) 抗血清采用硫酸铵沉淀法纯化得到多克隆抗体,透析后冷冻干燥成粉末,于-20℃下保存备用。

[0056] 实施例5:丁烯磷、百治磷和氧乐果三种农药ELISA检测方法的建立

[0057] 采用间接竞争ELISA法,步骤如下:

[0058] (1) 以包被原包被酶标板,每孔100 μ L,置于4℃下过夜,取出酶标板恢复至室温,弃去包被液,用PBST洗涤液洗涤3次,每次3min,拍干酶标板;

[0059] (2) 用5%脱脂奶粉封闭,每孔200 μ L,于37℃下水浴3h,弃去封闭液,用PBST洗涤液洗涤3次,每次3min,拍干酶标板,放置37℃烘箱烘干备用;

[0060] (3) 用PBST洗涤液将丁烯磷、百治磷和氧乐果三种农药均配置成10000、5000、1000、500、100、10、1.0、0.1 μ g/L的系列质量浓度,另设1个PBST空白对照,用PBST将抗体稀释至 10^5 倍,然后使系列质量浓度的农药溶液或空白与抗体等体积混合,于37℃反应30min,得到预孵育液体;

[0061] (4) 将预孵育好的液体加到酶标板中,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C水浴反应90min,用PBST洗涤液洗涤3次,每次3min,拍干酶标板;

[0062] (5) 用PBST将辣根过氧化酶标记的羊抗兔二抗稀释5000倍,每孔100 μ L加入酶标板,37 $^{\circ}$ C水浴中温育30min,用PBST洗涤液洗涤3次,每次3min,拍干酶标板;

[0063] (6) 将TMB底物溶液加入酶标板中,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C水浴显色15min,再向每孔中加入50 μ L浓度为10%的硫酸溶液终止反应,于450nm波长下测各孔的吸光值。

[0064] (7) 以所获吸光值的平均值计算抑制率,并OriginPro软件制作各个药物的标准曲线,计算药物抑制中浓度、最低检测限和线性范围,

[0065] 结果如表1所示。

[0066] 抑制率计算公式为:

$$[0067] \text{抑制率} (\%) = \frac{(A_{\max} - A_{\min}) - (A_x \times A_{\min})}{A_{\max} - A_{\min}} \times 100 (\%)$$

[0068] 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。

[0069] 表1应用本发明E11SA方法的检测结果

	药物	IC50 (μ g/mL)	最低检测限 (μ g/mL)	线性范围 (μ g/mL)
[0070]	丁烯磷	0.081	0.005	0.021-0.785
	百治磷	0.066	0.001	0.015-0.689
	氧乐果	0.075	0.003	0.019-0.721

专利名称(译)	一种丁烯磷、百治磷和氧乐果抗体的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN106543284A	公开(公告)日	2017-03-29
申请号	CN201610980250.5	申请日	2016-11-08
[标]申请(专利权)人(译)	佛山市飞时达新材料科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	佛山市飞时达新材料科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	佛山市飞时达新材料科技有限公司		
[标]发明人	叶青		
发明人	叶青		
IPC分类号	C07K16/06 C07K16/44 G01N33/535		
CPC分类号	C07K16/44 C07K16/065 G01N33/535 G01N2430/10		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种丁烯磷、百治磷和氧乐果三种农药抗体的制备方法及应用，通过制备通用半抗原，采用活性酯法使半抗原偶联牛血清蛋白(BSA)制备免疫原，采用混合酸酐法使半抗原偶联钥孔血蓝蛋白(KLH)制备包被原，将免疫原免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体，基于该抗体建立的酶联免疫分析方法(ELISA)可用于检测丁烯磷、百治磷和氧乐果三种有机磷酸酯类农药，该方法的检测成本低，特异性强，灵敏度高，操作简便，稳定性和重复性好，测定结果可靠，且能在室外进行大批量样品的快速检测。

