

[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 200810101552.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009年9月9日

[11] 公开号 CN 101526527A

[22] 申请日 2008.3.7

[21] 申请号 200810101552.6

[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 邵晓龙

[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1页 说明书7页

[54] 发明名称

一种适用于五氯硝基苯残留分析的 ELISA 试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了一种适用于五氯硝基苯残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒，包括包被了五氯硝基苯包被抗原的酶标板、浓缩洗涤液、五氯硝基苯标准品、五氯硝基苯多克隆抗体、酶标二抗、显色液、反应终止液。检测已知浓度的五氯硝基苯并绘制标准曲线，可以推算出待测五氯硝基苯的浓度。本发明的优点是能准确灵敏地检测环境中的五氯硝基苯残留，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. 一种适用于五氯硝基苯残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒，包括包被五氯硝基苯抗原的酶标板、浓缩洗涤液、五氯硝基苯标准品、五氯硝基苯特异性抗体、酶标记物、底物显色液和反应终止液。

2. 根据权利要求1所述的酶联免疫吸附检测试剂盒，其中，五氯硝基苯抗体在制备过程中所用的免疫原是五氯硝基苯半抗原与载体蛋白 BSA 的偶联复合物；所述五氯硝基苯抗原是五氯硝基苯与载体蛋白 OVA 的偶联复合物。

3. 根据权利要求1或2所述的酶联免疫检测试剂盒，其中，所述酶标记物是酶标二抗。

4. 根据权利要求3所述的酶联免疫检测试剂盒，其中，所述酶标二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体。

5. 根据权利要求1或2所述的酶联免疫吸附检测试剂盒，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。

6. 根据权利要求1或2所述的酶联免疫吸附检测试剂盒，其特征在于，当标记酶为辣根过氧化物酶时，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所述的酶联免疫吸附检测试剂盒，其中，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 $\mu\text{L}$ , 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。

8. 权利要求1~7任一项所述的检测试剂盒在检测五氯硝基苯残留中的应用。

## 一种适用于五氯硝基苯残留分析的 ELISA 试剂盒

### 技术领域

本发明涉及一种酶联免疫吸附分析 (ELISA) 试剂盒, 具体地说, 涉及一种适用于五氯硝基苯残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒。

### 背景技术

五氯硝基苯 (PCNB) 主要用作拌种剂和土壤消毒剂, 用于防治棉花苗期病害、麦类黑穗病以及蔬菜和果木的多种病害。在中草药的栽培过程中使用量很大, 尤其是作为防治人参病害的药剂在国内外广泛使用。五氯硝基苯主要损害心血管系统、中枢神经系统、肝、肾和造血系统。我国强制性国家标准规定在蔬菜和原粮中五氯硝基苯的最高残留限量分别是 0.2 和 0.1mg/kg, 欧盟于 2001 年 1 月开始禁用五氯硝基苯。

五氯硝基苯的常规检测方法包括气相色谱、高效液相色谱等, 应用这些理化分析技术对环境、生物、食品等样品中痕量五氯硝基苯残留进行分析, 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

针对上述不足, 本发明提供一种具有高特异性、高灵敏度、高准确度、高精确度、操作方法简单的酶联免疫吸附检测试剂盒, 用于环境中五氯硝基苯残留的批量、快速检测。

## (二) 技术方案

为实现上述目的, 本发明提供了一种五氯硝基苯残留分析酶联免疫吸附检测试剂盒, 该试剂盒包括包被了五氯硝基苯包被抗原的酶标板、浓缩洗涤液、五氯硝基苯标准品、五氯硝基苯特异性抗体、酶标记物、底物显色液、反应终止液。

其中, 五氯硝基苯抗体的制备过程中所用的免疫原是五氯硝基苯半抗原与载体蛋白的偶联复合物, 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; 所述多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体, 优选为兔源多克隆抗体。

其中, 包被了五氯硝基苯包被抗原的酶标板的制备过程中, 所用的包被抗原是五氯硝基苯半抗原与卵清蛋白的偶联复合物, 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 $\mu\text{L}$ , 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, pH2.4-2.6。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，加入待测五氯硝基苯样品和五氯硝基苯多克隆抗体后，固相包被抗原和待测五氯硝基苯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，所以当待测的五氯硝基苯浓度高时，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，用洗涤液洗涤后加入底物显色液，显色反应浅，用酶标仪检测的 OD 值低，表明抑制率高；反之，当待测五氯硝基苯浓度低时，则所测的 OD 值高，抑制率低。根据用已知的五氯硝基苯浓度检测所作的标准曲线，可以推算出待测五氯硝基苯的浓度。

### （三）有益效果

本发明的优点是能准确灵敏地检测环境中的五氯硝基苯残留，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五氯硝基苯残留现场监控技术具有重要的现实意义。

### 具体实施方式

以下实施例用于对本发明的进一步说明，但不用来限制本发明所要保护的范围。

#### 实施例 1 试剂盒操作及结果计算

待测样品经前处理后，用 PBST 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，10 ng/mL，50 ng/mL，100 ng/mL，500ng/mL，2000ng/mL 的五氯硝基苯标准液，加入 50 $\mu$ L 标样或处理好的样品到各孔中，标样和样品做 4 个重复，加入 50 $\mu$ 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 5 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 $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟; 倒出孔中的液体, 用 PBST 洗板 5 次, 拍干; 取 A 液和 B 液等体积混匀, 每孔加 100 $\mu$ L, 在 37 $^{\circ}$ C 显色 30 分钟, 每孔加入 50 $\mu$ 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 ng/mL 标准品孔的 OD 值减去含最大浓度标准品孔的 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, 绘制五氯硝基苯标准抑制曲线。根据曲线的回归方程可以求出对应样品的浓度, 也可以求出五氯硝基苯抑制中浓度  $IC_{50}$  ( $B/B_0=50\%$ ) 及最小检测限  $IC_{20}$  ( $B/B_0=80\%$ )。其中, 抑制中浓度  $IC_{50}=37$  ng/ml, 最低检测限  $IC_{20}=7.2$  ng/ml。

### 实施例 2 半抗原的合成

称取 2g 五氯酚 (pentachlorophenol, PCP) 和 1g  $K_2CO_3$  溶于 30mL 丙酮中, 加入到反应器中, 在氮气的保护下, 加入 1.14g 溴丙酸, 加热回流反应 2 个小时, 再加入 0.5g 溴丙酸, 保持以上条件不变反应过夜 (反应生成的气体通入 NaOH 吸收瓶吸收)。减压蒸除有机溶剂, 剩余物质用浓盐酸和二氯甲烷分开, 弃掉无机相, 有机相用无水  $Na_2SO_4$  干燥, 减压蒸除有机溶剂后, 用硅胶柱层析净化即得到所需半抗原粗产品。收率 50%。

### 实施例 3 五氯硝基苯多克隆抗体制备

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, 获得较纯的五氯

硝基苯多克隆抗体。

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/LNaOH 浸泡 30min, 蒸馏水反复洗至中性; 接着用 0.5mol/LHCl 浸泡 30min, 蒸馏水反复洗至中性; 再用 0.5mol/LNaOH 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) 将五氯硝基苯抗原稀释成 1 $\mu$ g/mL, 每孔加入 100 $\mu$ L, 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 $\mu$ L 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 五氯硝基苯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) 包被了五氯硝基苯抗原的酶标板
- (2) 海绵支架
- (3) 1mg/mL 五氯硝基苯标准品
- (4) 五氯硝基苯多克隆抗体
- (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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，吐温-20 100 $\mu\text{L}$ ，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

使用实施例 5 中的试剂盒，进行实验。选择五氯硝基苯的结构类似物五氯酚、六氯苯、2, 4-D、五氯酚乙酯、PCB、半抗原、甲酯化半抗原作为待测物，测得各种物质的抑制中浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )，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，则抗体对五氯硝基苯的特异性愈强，反之则抗体的特异性差。

$$\text{交叉反应 (CR\%)} = \text{IC}_{50}(\text{五氯硝基苯}) / \text{IC}_{50}(\text{供试物}) \times 100\%.$$

实验测定结果见表 1，采用间接 ELISA 法，多克隆抗体对与五氯硝基苯结构类似物存在一定的交叉反应，多克隆抗体对六氯苯的交叉反应较大为 12%，而对合成半抗原的原料五氯酚 (PCP) 的交叉反应较小。半抗原、甲酯化半抗原、酯化的 PCP 的交叉反应分别是 230%、15%和 8%，但这些物质在自然界中不存在，抗体不会受到上述物质的干扰。而对其它结构相近或相似物质则均无明显的交叉反应。说明该试剂盒的特异性好，可保证对样品中五氯硝基苯残留测定结果的可靠性。

表 1 交叉反应

Table 1 Cross Reactivities of Indirect ELISA Kit

化合物名称	交叉反应 (%)
五氯硝基苯	100
半抗原	230
甲酯化半抗原	15
五氯酚	3

六氯苯	12
2, 4-D	<2
五氯酚乙酯	8
PCB (42)	<1.5

### 实施例 7 回收试验

使用实施例 5 中的试剂盒，进行实验。井水、河水、土壤添加五氯硝基苯后，用试剂盒测定其含量，结果见表 2。

表 2 井水、河水、土壤中添加五氯硝基苯的 ELISA 测定结果

样品	添加浓度 (ppb)	回收率 (%)
井水	500	88
	100	87
	10	90
河水	500	85
	100	81
	10	80
土壤	200	79

专利名称(译)	一种适用于五氯硝基苯残留分析的ELISA试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101526527A</a>	公开(公告)日	2009-09-09
申请号	CN200810101552.6	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 邵晓龙		
发明人	李季 许艇 邵晓龙		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
代理人(译)	王朋飞		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种适用于五氯硝基苯残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒，包括包被了五氯硝基苯包被抗原的酶标板、浓缩洗涤液、五氯硝基苯标准品、五氯硝基苯多克隆抗体、酶标二抗、显色液、反应终止液。检测已知浓度的五氯硝基苯并绘制标准曲线，可以推算出待测五氯硝基苯的浓度。本发明的优点是能准确灵敏地检测环境中的五氯硝基苯残留，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。

化合物名称	交叉反应 (%)
五氯硝基苯	100
半抗原	230
甲酯化半抗原	15
五氯酚	3