(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101012239 B
(45)授权公告日 2010.11.10

(21)申请号 200710063108.5

(22)申请日 2007.01.26

(73)专利权人 中国农业大学
地址 100094 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 韩丽君 马永强 钱传范 江树人

(51)Int.Cl.
C07F 9/177(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/577(2006.01)

(56)对比文件

CN 1677108 A,2005.10.05, 全文.

韩丽君. 有机磷农药的酶免疫化学研究. 中国农业大学博士学位论文. 2003, 第24页.

审查员 李宗韦

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

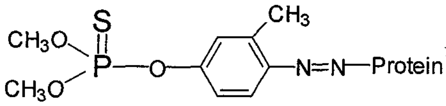
(54)发明名称

杀螟硫磷半抗原、人工抗原、特异性抗体及其用途

(57)摘要

本发明提供了一种杀螟硫磷半抗原O,O-二甲基-O-[-3-甲基-4-氨基苯基]硫逐磷酸酯(简称FNH2)、人工抗原、及特异性抗体。本发明首先通过锌粉在酸性条件下使杀螟硫磷分子结构中的硝基还原成为氨基,反应得到可与载体蛋白结合的半抗原分子,将半抗原与蛋白质通过重氮化法偶联得到免疫原和包被原,免疫原免疫动物后可制得能与杀螟硫磷特异性反应的抗体。本发明还提供了基于上述特异性抗体的酶联免疫分析试剂盒,其具有特异性高、灵敏度高、准确度高,操作简单快速等优点。

1. 一种杀螟硫磷人工抗原，其特征在于分子结构为：



其中，Protein 为载体蛋白。

2. 如权利要求 1 所述的人工抗原，其中所述载体蛋白为 BSA、OVA、RSA 或 HSA。

3. 一种杀螟硫磷特异性抗体，其是采用权利要求 1 或 2 所述的人工抗原免疫动物获得。

4. 含有权利要求 3 所述特异性抗体的 ELISA 检测试剂盒。

5. 权利要求 3 所述的特异性抗体在检测样品的杀螟硫磷残留量中的应用。

6. 如权利要求 5 所述的应用，其特征在于，所述样品为食品、农产品或环境样品。

7. 如权利要求 6 所述的应用，其特征在于，所述环境样品为土壤样品或水样品。

杀螟硫磷半抗原、人工抗原、特异性抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学领域，具体涉及一种杀螟硫磷半抗原、人工抗原以及以此抗原制备成特异性抗体，本发明还涉及此半抗原、人工抗原、特异性抗体的用途。

背景技术

[0002] 由于农药使用技术的不断发展和使用规模的不断扩大，农药残留造成的环境影响和对人类健康的慢性和长期效应日益受到人们的关注和担忧，在生活消费和对外贸易中对农药残留的限制也越来越严格，对分析检测对象、种类、数量、范围、指标等诸多方面提出了新的要求和更高的标准。在农药及其代谢物的残留分析检测方面，传统的分析检测方法主要依靠气相色谱 (GC)、高效液相色谱 (HPLC)、质谱 (MS) 等物理化学分析手段，但这些分析方法通常都需要繁琐复杂的前处理工作，因此检测工作中工作量大、仪器昂贵、并需要有熟练的技术人员及较长的分析周期。因此人们迫切希望有一种简单、快速、灵敏及廉价的检测技术能在田间、市场或实验室内进行大批量的检测应用。免疫分析法真正具备了这些优点，因此，尽管将免疫分析用于农药残留分析的时间很短，却很快在环境样品和食品样品的农药残留分析中得到了广泛的应用。

[0003] 杀螟硫磷 [fenitrothion,O,O- 二甲基 -O-(3- 甲基 -4- 硝基苯基) 硫代磷酸酯]，商品名为杀螟松等，是一种广谱有机磷杀虫剂，广泛应用于稻谷、大麦、玉米及经济类作物的害虫防治，也可防治棉花、蔬菜、茶叶、果树上的多种害虫，对稻螟有特效，也可专用于原粮及种子粮的储粮害虫。杀螟硫磷对高等动物低毒，常温下对日光稳定，遇碱易分解失效，在水果、蔬菜上的安全间隔期为 10 ～ 15 天。随着杀螟硫磷等农药使用量的增加，尤其是在作物和蔬菜上的大量使用，对人体健康造成许多的危害，这已经引起人们的普遍关注。因此开发一种简单快速、适用于农药残留现场监控的痕量分析方法具有重要的应用价值。

[0004] 在农药残留分析中，杀螟硫磷的常规检测方法是气相色谱法，但该方法需要对样品进行繁琐的提取、净化、浓缩等前处理步骤，且该方法需要昂贵的色谱仪器，操作过程复杂且耗时较长，不适合于大批量样品的检测与分析。免疫分析为杀螟硫磷的残留检测提供了一个新的分析检测途径。然而，由于绝大多数农药分子属于小分子，而小分子化合物一般不具有免疫原性，不能直接免疫动物产生特异性抗体，因此，必须合成突出分子立体结构特异性部位的半抗原，并与大分子载体连接构成有效的人工结合物，才能免疫动物产生针对这一目标小分子化合物的特异性抗体。这种半抗原与大分子载体的结合物称为人工抗原。人工抗原的制备需要考虑各种因素，包括结合位点、结合方式、载体种类及半抗原与目标分析物的结构上的差异，这些因素都可能会影响到相应抗体的性质。因此，它是决定产生其特异性抗体质量和建立免疫化学分析方法的关键。

[0005] 目前，尚未有专门关于半抗原分子设计及其免疫识别机制研究的论述或著作。一般来说，半抗原的分子设计应考虑两个方面的因素 ：第一，能否刺激机体产生免疫应答 ；第二，产生的抗体能否具有预期的活性，即其免疫识别能否达到预期的效果。“理想的”半抗原首先应尽可能多的反映待分析物的特征化学结构，特别是立体化学结构 ；其次，“理想的”半

抗原应有一个便于抗体对靶结构识别的柄(或间隔臂),以便分子的特异性结构能够最大限度的暴露于载体表面,从而保留特异性,对于间隔臂通常应考虑其长度、极性和位置;最后,“理想的”半抗原应具有与载体蛋白等偶联的功能团,如 -COOH,-NH2,-OH,-SH 等官能团。总之,对于不同的目标农药化合物,其半抗原的分子设计是不同的,同一种农药,半抗原的分子设计也可以从多个位点出发,设计出不同结构的半抗原,分别制备出相应的多克隆或单克隆抗体。

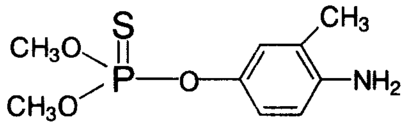
[0006] 在杀螟硫磷的免疫分析方法研究中,半抗原和人工抗原的制备也是一样的。对半抗原的要求是性质稳定,具有目标化合物的特征结构或特征官能团,具有适当长度的间隔臂,且具有一定的活性基团能够与载体蛋白发生偶联反应。本研究拟通过设计合成杀螟硫磷半抗原,将半抗原与载体蛋白偶联得到人工抗原,免疫动物从而产生杀螟硫磷多克隆抗体,在此基础上建立杀螟硫磷的 ELISA 分析方法,并用于制备杀螟硫磷残留检测的免疫分析试剂盒。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种新结构的杀螟硫磷半抗原,并将该半抗原与不同的载体蛋白偶联,制备可用于杀螟硫磷免疫分析研究的杀螟硫磷人工抗原;以此人工抗原制备的特异性抗体;以及此类半抗原、人工抗原及抗体的用途。

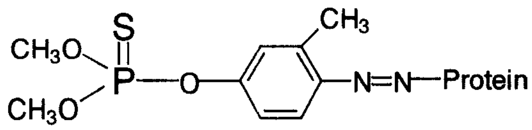
[0008] 本发明的杀螟硫磷半抗原为 O,O- 二甲基 -O-[-3- 甲基 -4- 氨基苯基] 硫逐磷酸酯(简称 FNH2),它的分子结构式为:

[0009]



[0010] 将上述杀螟硫磷半抗原与载体蛋白偶联得到杀螟硫磷人工抗原,它的分子结构式为:

[0011]



[0012] 其中,蛋白质载体 Protein 可以是牛血清白蛋白 (BSA)、卵清蛋白 (OVA)、兔血清白蛋白 (RSA) 或者人血清白蛋白 (HSA) 等。

[0013] 将上述杀螟硫磷人工抗原免疫动物得到与杀螟硫磷发生特异性免疫反应的单克隆或多克隆抗体。

[0014] 本发明同时提供了上述杀螟硫磷半抗原的用途,是用作动物免疫的抗原体系的原料。

[0015] 本发明同时提供了上述杀螟硫磷特异性抗体的用途,用于检测食品、农产品和环境样品中杀螟硫磷的残留量。

[0016] 本发明同时提供了含有上述杀螟硫磷人工抗原、特异性抗体的杀螟硫磷残留量的免疫分析试剂盒。

[0017] 基于杀螟硫磷其取代苯基硫代磷酸酯是其特异性官能团,经过强的还原剂的作

用，使杀螟硫磷氨基化的方法，使苯环上的硝基变成为能与载体蛋白连接的氨基，合成了半抗原（化学名称为 O，O- 二甲基 -O-[-3- 甲基 -4- 氨基苯基] 硫逐磷酸酯）（简称 FNH2）。该半抗原合成方法简便，最大可能的保留了原来杀螟硫磷的结构，为获得特异性抗体提供了保证。

[0018] 本发明的杀螟硫磷半抗原的设计的位点在杀螟硫磷分子结构中的硝基位置，把苯环上对位的硝基通过化学合成改造成氨基，使其具有可以与蛋白质偶联的基团 -NH2。本发明中合成的杀螟硫磷半抗原化合物为国内外首创的新化合物，最大程度的保留了杀螟硫磷的化学结构，用这种半抗原制备的免疫抗原去免疫动物，所得到的抗体的效价、特异性、亲和力都比较好，与其他有机磷农药的交叉反应率都很低。

附图说明

[0019] 图 1 是直接竞争 ELISA 法杀螟硫磷的标准曲线 ；

[0020] 图 2 是间接竞争 ELISA 法杀螟硫磷的标准曲线。

[0021] 具体实施方法

[0022] 在下面实施例中更详细地描述本发明，并非对本发明的限制，其中比例和百分比在没有特殊说明的情况下均为重量 / 重量比。

[0023] 实施例 1 杀螟硫磷半抗原、人工抗原及其抗体的制备

[0024] 1. 半抗原 O，O- 二甲基 -O-[-3- 甲基 -4- 氨基苯基] 硫逐磷酸酯（简称为 FNH2）的合成

[0025] 半抗原 FNH2 的合成是通过杀螟硫磷的氨基化来完成的。合成路线如下 ：

[0026]

[0027] 具体操作如下 ：

[0028] 取杀螟硫磷原药约 2.0g，溶于 20ml 乙醚，用 2X10ml 冷的 1％的碳酸钠溶液洗涤 2 次，分出乙醚层，转入三颈瓶中，加入乙酸 / 盐酸 (9 ∶ 1) 溶液 20ml，加入 4g 锌粉，回流 1.5h，过滤。将滤渣用 30mL CCl_4 洗涤三次，然后用蒸馏水 30ml 洗涤 CCl_4 相，弃水相。将滤液加 10％ NaOH 调节 pH 值到中性，此时有絮状沉淀出现，用乙醚 4×25ml 提取。将乙醚和前述 CCl_4 相合并，加入无水硫酸钠干燥过夜。减压蒸去乙醚，得到黄色油状物。

[0029] 向黄色油状物中加水 10ml，用 1M HCl 调节 pH 到 1-2，分去不溶物，用正己烷 2×10ml 洗涤水相，弃去正己烷。水层用 10％ NaOH 调节 pH 为 10-11，用 $CHCl_3$2×20ml 萃取，弃水相。合并 $CHCl_3$ 层，加 8g 无水硫酸钠干燥过夜，减压蒸去溶剂，得到深红色油状物约 1.3g，产率约 68％。

[0030] 半抗原 FNH2 产物的结构鉴定 ：取上述合成的产物分别经 IR、MS 和 ^{1}H-NMR 测定其分子结构。

[0031] (a) 红外光谱 IR ：

[0032] cm^{-1} ：3320(m，N-H)，2940(s，C-H)，1620(s，C ＝ C)，1510(s，P ＝ S)，

[0033] 1425(s，C-N)，1200(s，P-O).

[0034] (b) 质谱测定 EI：

[0035] m/z 为：247[56, M^+], 125[28, M^+-122], 124[62, M^+-123], 123[15, M^+-124], 107[22, M^+-141].

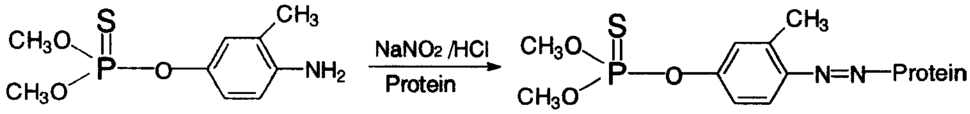
[0036] (c) 核磁共振 (1H-NMR, 300MHz, $CDCl_3$)：

[0037] δ ppm：2.36(s, Ar-CH_3), 3.48(s, 2H, NH_2), 3.76(s, 3H, CH_3), 3.92(s, 3H, CH_3), 8.10-7.55(m, 3H, Ar-H).

[0038] 2. 人工抗原的合成与纯化

[0039] 人工抗原的合成，采用重氮化法使半抗原通过氨基与载体蛋白发生偶联，合成路线如下：

[0040]



[0041] 具体操作如下：

[0042] 取制备得到的半抗原 FNH20.05g(约 0.2mmol)，溶于 12.5ml 0.08mol/lHCl 溶液中，倒入三颈瓶搅拌，冰浴下降温至 0℃，逐滴加入预先冷却的 $NaNO_2$ 溶液 (0.07g 溶于 10ml 水中)，冰浴 (0-2℃) 反应 2h，加尿素 0.05g 除去过量的 HNO_2。

[0043] 称取 BSA(或者 OVA) 蛋白 250mg 溶于 50ml pH8.7 的硼酸盐缓冲溶液中，滴入到上述偶氮溶液中，滴毕，保持 0℃反应 2h 后，将反应液装入透析袋，先用蒸馏水透析 2-4 次，然后用生理盐水透析 3 天，分装保存于 -20℃的冰箱中待用。

[0044] 人工抗原结合比的测定：

[0045] 按合成杀螟硫磷免疫抗原反应所用的半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例，分别进行紫外扫描测定，紫外扫描结果表明，偶联后的产物在最大吸收波长从原来的 215nm 移动到了 220nm 并且在 276nm 处与蛋白的最大吸收产生了叠加效应，通过比较三者分别在最大吸光值的吸光度值计算其结合比。经计算结果如下：半抗原与 BSA 的结合比为 12 ∶ 1，与 OVA 的结合比为 10 ∶ 1。

[0046] 3. 抗体的制备

[0047] 免疫动物制备抗血清：

[0048] 实验选用健康雄性新西兰大白兔，每种免疫原免疫 3 只兔子，分别编号为 1-3。实验免疫剂量基础免疫为 0.5-1.0mg/kg，加强免疫剂量为 1.0-1.5mg/kg，用生理盐水稀释适量BSA结合物，加入等体积弗氏完全佐剂(加强免疫时采用弗氏不完全佐剂)，充分乳化，直至滴入水中乳滴不分散。采用背部皮下多点注射与大腿肌肉注射相结合的方法。三周后进行加强免疫，以后每隔两周进行再次加强免疫。从第三次免疫开始，每次免疫后第 8 天，从兔子耳缘静脉采血，测定效价。

[0049] 抗体的纯化：

[0050] 一般采用辛酸 - 硫酸铵盐析法，也可采用蛋白 A 柱层析法。本实验采用辛酸 - 硫酸铵盐析法。辛酸在偏酸性的条件下能将血清中除 IgG 以外的蛋白质都沉淀下来，上清中只有 IgG。辛酸加入因抗体的来源不同而不同，兔血清为 75μg/ml，小鼠血清为 40μg/ml，小鼠腹水为 33μg/ml。这种方法 IgG 的回收率达到 90％以上。最后将抗体制成冻干粉，分装，-20℃保存。

[0051]　抗血清效价的测定：

[0052]　免疫程序开始后，从加强免疫第二次开始，每次免疫后第 8 天于兔子耳缘静脉采血，血清经适当稀释后用间接 ELISA 测定效价。第 5 次免疫后，兔子获得了高效价的抗体，抗血清的效价为 1 ∶ 12500（指 OD490nm 值等于 1.0）。

[0053]　实施例 2 试剂盒的装配

[0054]　本发明将制备的人工抗原和抗体应用于制备适合于杀螟硫磷残留检测的免疫分析试剂盒，该试剂盒包括盒体、盒体内的 96 孔 /40 孔酶标板和检测试剂，在酶标板的每孔内，由包被液包被能与抗杀螟硫磷抗体特异性结合的包被抗原，并用 2％～ 5％的明胶进行封闭。

[0055]　盒内试剂包含：洗涤液（稀释液）、底物稀释液、抗杀螟硫磷抗体（适用于间接 ELISA）、杀螟硫磷标准溶液、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体（适用于间接竞争 ELISA）或辣根过氧化物酶标记的抗杀螟硫磷兔抗体（适用于直接竞争 ELISA）、底物、显色物质和反应终止液，配制方法如下：

[0056]　洗涤液（反应稀释液）40mL，组成比例为磷酸二氢钾 0.1g、磷酸氢二钠 4g、氯化钾 0.1g、吐温 -203mL、双蒸水 1000mL，为正常使用的 15 ～ 30 倍浓缩液；

[0057]　底物稀释液 50mL，配制如下：柠檬酸 3g、磷酸氢二钠 1g、双蒸水 1000mL，为正常使用的 5 ～ 10 倍浓缩液；

[0058]　酶底物为 30％过氧化氢 15mL，显色剂为 3,3′，5,5′ - 四甲基联苯胺 (TMB) 溶液 15mL 或者邻苯二胺 (OPD) 固体粉末 20mg；

[0059]　抗杀螟硫磷抗体 (IgG)400mL，工作浓度为 1 ∶ 1000（间接 ELISA 法）；所述的抗杀螟硫磷抗体 (IgG) 为通过半抗原和牛血清白蛋白合成的偶联物作为免疫原注射家兔后产生的能与杀螟硫磷分子、杀螟硫磷包被原进行特异性结合的免疫球蛋白 (IgG)；

[0060]　辣根过氧化物酶标记的抗杀螟硫磷兔抗体（直接 ELISA 法）或者辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体（间接 ELISA 法）200μL，为正常使用时 800 ～ 1500 倍浓缩液；上述辣根过氧化物酶标记的杀螟硫磷抗体为抗杀螟硫磷抗体 (IgG) 与辣根过氧化物酶 (HRP) 结合形成的复合物；

[0061]　反应终止液 30mL，为 2mol/L 硫酸；

[0062]　杀螟硫磷不同浓度系列 (0.1、0.5、2、10、50、100mg/L) 标准溶液 6 瓶，1 ～ 4mL/ 瓶，甲醇定容，使用时用 PBST 稀释 10 倍。

[0063]　实施例 3 酶标抗体的制备（改良过碘酸钠法）

[0064]　称取 5 ～ 10mg 辣根过氧化物酶 HRP 溶解于 1L 蒸馏水中，加入 0.2 ～ 0.4mL 新配的 0.1mol/L $NaIO_4$ 溶液，室温下避光搅拌 15 ～ 30min。将上述溶液装入透析袋中，用 1mmol/L pH4.4 的醋酸盐缓冲溶液透析，4℃过夜。用 pH 9.5 的碳酸盐缓冲溶液使上述醛化的 HRP 溶液的 pH 升高到 9.0 ～ 9.5，然后立即加入 1 ～ 2mL 含有 10 ～ 20mg 纯化抗体的 0.01mol/L 碳酸盐缓冲溶液，室温避光搅拌 2 ～ 3 小时。加 0.1 ～ 0.2mL 新配的 4mg/mL NaBH4 溶液，混匀，再置 4℃ 2 ～ 3 小时。将反应液装入透析袋中，用 0.15mol/L pH7.4 的 PBS 透析，4℃过夜。在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵溶液，置 4℃ 1 ～ 2 小时。3000rpm 离心半小时，弃上清液。沉淀物用半饱和硫酸铵溶液洗而二次，最后沉淀物溶解于少量 0.15mol/L pH7.4 的 PBS 中。将上述溶液装入透析袋中，用 0.15mol/L pH7.4 的 PBS 缓冲液透析，去除铵离子

后(用萘氏试剂检测),离心,上清液即为酶结合物,用等量甘油分装后,分别于 -4℃、-20℃保存。

[0065] 实施例 4 包被酶标板的制备

[0066] 包被抗原(FEN-OVA)用 pH 9.6 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液(含 1 ～ 2g 碳酸钠和 2 ～ 4g 碳酸氢钠,双蒸水 1L)稀释成 0.5 ～ 4μg/mL,在酶标板的每孔加 100μL,4℃下包被过夜或 37℃包被 2 小时,倾去包被液,用 PBST 洗涤 3 次,拍干,然后在每孔中加入 150μL 2％～ 5％的明胶,放入 37℃恒温箱中封闭 0.4 ～ 1 小时后,用 PBST 洗涤 3 次,拍干后干燥保存。

[0067] 实施例 5

[0068] 检测样品的前处理 :

[0069] 水样 :过滤后即可取样进行 ELISA 分析。

[0070] 土样 :取 10g 土壤样本用 20 ～ 40mL 丙酮提取三次,合并提取液,浓缩,然后用 PBST 稀释定容至 10mL,进行 ELISA 分析。

[0071] 蔬菜样品 :取蔬菜样品用粉碎机粉碎后称取 10g,用 20 ～ 40mL 丙酮提取三次,合并提取液,浓缩,用 PBST 定容至 10mL,取样进行 ELISA 分析。

[0072] 血液 :取人体血液,加抗凝素后直接用 ELISA 法进行分析。

[0073] 洗胃液(2％碳酸氢钠溶液):取 10mL 洗胃液,用稀 HCl 调节 pH 值到中性后即可用 ELISA 法进行分析。

[0074] 呕吐物 :取样品研碎,离心取上清液用 ELISA 法进行分析。

[0075] 实施例 6

[0076] 试剂盒操作过程如下 :

[0077] 1) 直接竞争 ELISA 法 :取出一块包被有杀螟硫磷包被抗原的酶标板,恢复到室温后备用 ;加入 50μL 标样或处理好的样品到各自孔中,标样和样品做 2 ～ 4 个重复 ;加入 50μL 稀释的酶标抗体,37℃孵育 1 ～ 2 小时 ;倒出孔中的液体,将微孔板倒置在吸水纸上拍打,以保证完全除去孔中的液体,用 200μL 稀释好的 PBST 洗涤 2 ～ 6 次,拍干 ;然后每孔加入 100μL 底物液与显色物质的混合液,轻微振匀,并在 37℃暗处孵育 15 ～ 25 分钟进行显色反应 ;加入 50μL 反应终止液,混合好后,测定 OD_{450nm} 或者 OD_{490nm} 值。

[0078] 2) 间接竞争 ELISA 法 :取出一块包被有杀螟硫磷包被抗原的酶标板,恢复到室温后备用 ;加入 50μL 标样或处理好的样品到各自孔中,标样和样品做 2 ～ 4 个重复 ;加入 50μL 稀释好的抗体,37℃孵育 1 ～ 2 小时 ;倒出孔中的液体,将微孔板倒置在吸水纸上拍打,以保证完全除去孔中的液体,用 200 稀释好的 PBST 洗涤 2 ～ 6 次,拍干 ;加入 100μL 稀释好的酶标二抗,37℃孵育 1 ～ 2 小时 ;倒出孔中的液体,将微孔板倒置在吸水纸上拍打,以保证完全除去孔中的液体,用 200μL 稀释好的 PBST 洗涤 2 ～ 6 次,拍干 ;然后每孔加入 100μL 底物液与显色物质的混合液,轻微振匀,并在 37℃暗处孵育 15 ～ 25 分钟进行显色反应 ;加入 50μL 反应终止液,混合好后,测定 OD_{450nm} 或者 OD_{490nm} 值。

[0079] 3) 以所获得的标样和样品吸光值的平均值计算各孔的吸光值和抑制率

[0080]

$$\text{抑制率}(\%)=\frac{(OD\max-OD\min)-(ODx-OD\min)}{(OD\max-OD\min)}\times100\%$$

[0081] 4)ODmax 为不加药时的吸光值,ODx 为农药 X 时的吸光值,ODmin 为空白对照孔的

吸光值。

[0082] 5) 计算的标样值绘成一个对应杀螟硫磷浓度 (mg/L) 的半对数坐标系统曲线图 (图 1、2),直接竞争 ELISA 法的校正曲线在 0.01 ～ 10mg/L 范围内为线性 ;间接竞争 ELISA 法的校正曲线在 0.005 ～ 10mg/L 范围内为线性,对应样品浓度可从校正曲线读出,也可根据标样的浓度与抑制率求出线性方程,然后求出对应样品的浓度。

[0083] 实施例 7 保存期试验

[0084] 将试剂盒放置于 4℃和 -20℃保存,分别取 0,20,40,60,120,180,240,300 和 360d 的试剂盒,以最佳抗体抗原工作浓度为测定浓度,进行标准样品检测,以测定其检测效果。保存期测定结果如下表 :

[0085] 表 1. 直接竞争 ELISA 法试剂盒保存期试验结果

[0086]

时间 (d)	0	20	40	60	120	180	240	300	360
OD_{492nm} (4℃)	1.069	1.067	1.066	1.064	1.063	1.062	1.062	1.060	1.058
OD_{492nm} (-20℃)	1.067	1.064	1.063	1.062	1.062	1.060	1.060	1.059	1.057

[0087] 表 2. 间接竞争 ELISA 法试剂盒保存期试验结果

[0088]

时间 (d)	0	20	40	60	120	180	240	300	360
OD_{492nm} (4℃)	1.116	1.115	1.113	1.112	1.110	1.108	1.106	1.104	1.100
OD_{492nm} (-20℃)	1.120	1.120	1.115	1.114	1.112	1.109	1.108	1.105	1.102

[0089] 以上结果可以看出,试剂盒在 4℃下至少可保存 12 个月以上。

[0090] 实施例 8 试剂盒灵敏度测定

[0091] 将杀螟硫磷标准溶液稀释成系列浓度,用直接 ELISA 法分析,得到以下曲线 (图 1),由图可得,直接 ELISA 法回归方程为 :$y = 44.92+16.44x$,杀螟硫磷在 0.01 ～ 10mg/L 范围内,log(B/B0) 与杀螟硫磷浓度的对数值呈线性关系,相关系数为 $r2 = 0.9431$,检出限为 0.01mg/L。用间接 ELISA 法分析得到以下曲线 (图 2),由图可得,间接 ELISA 法的回归方程为 :$y = 63.34+9.82x$,杀螟硫磷在 0.005 ～ 10mg/L 范围内,log(B/B0) 与杀螟硫磷浓度的对数值呈线性关系,相关系数为 $r2 = 0.9845$,检出限为 0.005mg/L。

[0092] 实施例 9 准确度试验和精密度试验

[0093] 取三个不同浓度的杀螟硫磷标样，添加到空白样品中，每个浓度设 6 个重复，进行测定。试剂盒回收率的结果如下，水为 96.8%～106.7%，蔬菜为 110.8%～117.5%。水样测定的变异系数均低于 5.5%，蔬菜的变异系数均低于 11.5%。

[0094] 实施例 10

[0095] 抗体的特异性试验

[0096] 抗体的特异性常用交叉反应性作为评价的重要标准，即所得到的抗体与其他不同结构的化合物抗原之间的交叉反应越小，抗体的特异性就越好。

[0097] 将目标化合物及其类似物做系列稀释，分别与得到的抗体，按制作标准曲线同样的方法制作标准曲线，并在曲线上得出抑制率 50%的剂量和类似物抑制率 50%时的用量，然后计算出各个类似物的交叉反应率。

[0098] 选择杀螟硫磷类似物如甲基对硫磷、对硫磷、倍硫磷、3- 甲基 -4- 硝基

[0099]

$$\text{交叉反应率（\%）}=\frac{\text{抑制率为50\%杀螟硫磷的浓度}}{\text{抑制率为50\%其他农药的浓度}}\times 100\%$$

[0100] 苯酚等，反应步骤同试剂盒操作过程，得到各种农药的抑制中浓度，再用下式计算农药对杀螟硫磷的交叉反应性。交叉反应率越小，反应的特异性越强。交叉反应率可按下式计算 ：

[0101] 本试验测定结果见表 3。从表 3 可知，间接 ELISA 法抑制率达 50%时，杀螟硫磷所需浓度为 13μg/L，其他几种农药所需浓度均大于 800μg/L。说明试剂盒的特异性好，可保证对样品中杀螟硫磷残留测定结果的可靠性。

[0102] 表 3 试剂盒特异性试验

[0103]

化合物名称	抑制中浓度（μg/mL）	交叉反应率（%）
杀螟硫磷	0.0136	/
甲基对硫磷	8.94	0.152
对硫磷	1560	＜0.001
倍硫磷	3200	＜0.001
3- 甲基 -4- 硝基 - 苯酚	2.38	0.571

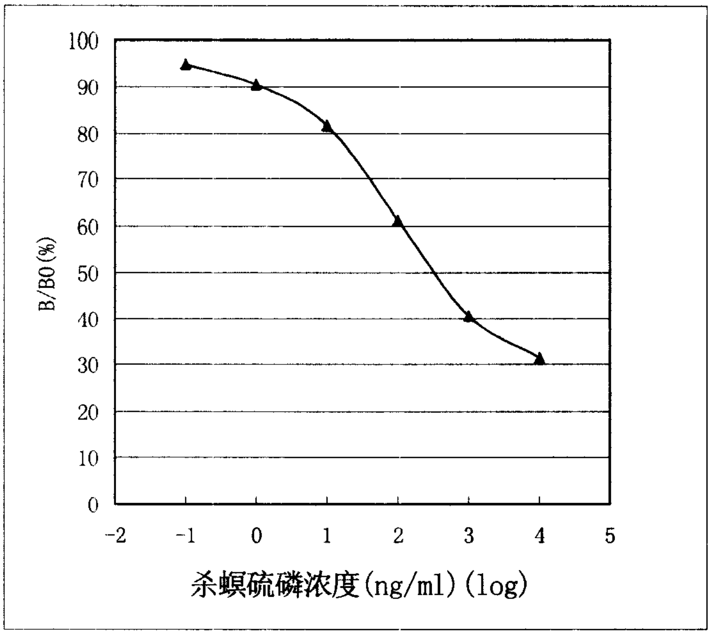

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
B/B0(%)
-2
-1
0
1
2
3
4
5
杀螟硫磷浓度(ng/ml)(log)

图 1

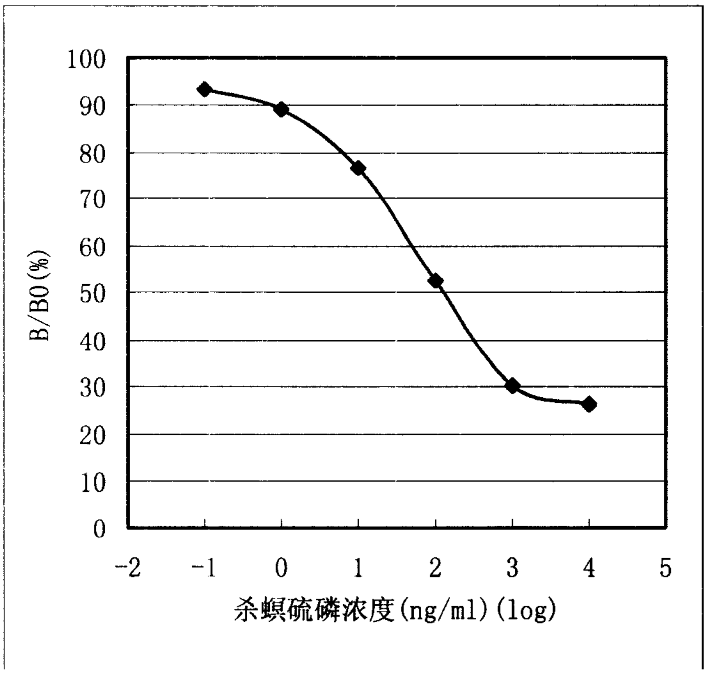

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
B/B0(%)
-2
-1
0
1
2
3
4
5
杀螟硫磷浓度(ng/ml)(log)

图 2

专利名称(译)	杀螟硫磷半抗原、人工抗原、特异性抗体及其用途		
公开(公告)号	CN101012239B	公开(公告)日	2010-11-10
申请号	CN200710063108.5	申请日	2007-01-26
[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	韩丽君 马永强 钱传范 江树人		
发明人	韩丽君 马永强 钱传范 江树人		
IPC分类号	C07F9/177 C07K16/18 G01N33/53 G01N33/577		
其他公开文献	CN101012239A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种杀螟硫磷半抗原O，O-二甲基-O-[-3-甲基-4-氨基苯基]硫逐磷酸酯(简称FNH2)、人工抗原、及特异性抗体。本发明首先通过锌粉在酸性条件下使杀螟硫磷分子结构中的硝基还原成为氨基，反应得到可与载体蛋白结合的半抗原分子，将半抗原与蛋白质通过重氮化法偶联得到免疫原和包被原，免疫原免疫动物后可制得能与杀螟硫磷特异性反应的抗体。本发明还提供了基于上述特异性抗体的酶联免疫分析试剂盒，其具有特异性高、灵敏度高、准确度高，操作简单快速等优点。