



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101135683 B

(45) 授权公告日 2011.06.01

(21) 申请号 200710133285.6

(22) 申请日 2007.10.16

(73) 专利权人 南京农业大学

地址 210095 江苏省南京市卫岗1号南京农业大学科技处钱宝英

(72) 发明人 王鸣华 施海燕 李波

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 张素卿

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

C07C 69/40 (2006.01)

C07C 63/331 (2006.01)

(56) 对比文件

尤海芹等. 拟除虫菊酯类农药半抗原合成方法进展. 《现代农药》. 2004, 第3卷(第4期), 第6-9页.

Luis O. Ruzo et al. Comparative

Metabolism of the Pyrethroids Bifenthrin and Deltamethrin in the Bulb Mite *Rhizoglyphus robini*. 《J. Agric. Food Chem》. 1988, 第36卷第1040-1043页.

P.A. Smith et al. Estimating occupational exposure to the pyrethroid termiticide bifenthrin by measuring metabolites in urine. 《Journal of Chromatography B》. 2002, 第778卷第113-120页.

审查员 张鑫蕊

权利要求书 1 页 说明书 7 页

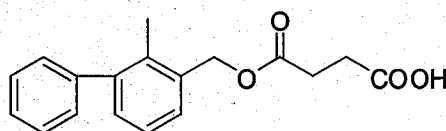
(54) 发明名称

联苯菊酯抗原、抗体及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种联苯菊酯抗原、抗体及其应用,属于免疫化学分析技术领域,专用于联苯菊酯特异性抗体的制备及酶联免疫检测方法。合成了半抗原 2-甲基-3-苯基苄基丁二酸酯(简称LBc)和 2-甲基-3-苯基苯甲酸(简称LBy),再将LBc与蛋白质偶联制备人工免疫抗原,免疫兔子获得联苯菊酯的特异性多克隆抗体,然后将LBy与蛋白质偶联制备包被抗原,最后利用合成的包被抗原和特异性抗体建立酶联免疫分析方法,联苯菊酯检测限达 0.016mg/L,线性范围为 0.01~50mg/kg,对大部分拟除虫菊酯及其代谢产物无明显的交叉反应。

1. 联苯菊酯人工半抗原,其特征在于它的分子结构式为:

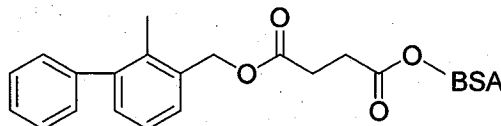


2- 甲基 -3- 苯基苄基丁二酸酯 LbC。

2. 权利要求 1 所述联苯菊酯人工半抗原的制备方法,其步骤如下:

- 1) 取 0.5 ~ 5g 联苯醇于 100mL 三口烧瓶中,加入 5 ~ 15mL 无水吡啶,0.3 ~ 3g 丁二酸酐,40 ~ 50℃避光磁力搅拌反应 10 ~ 12h;
- 2) 反应后的混合液在 3.6% 盐酸和乙酸乙酯间进行分配,取乙酸乙酯层;
- 3) 乙酸乙酯层再用水洗,上层过无水 Na_2SO_4 ,浓缩近干;
- 4) 柱层析法纯化,石油醚湿法装柱,收集洗脱液为 95 : 5 的氯仿 : 甲醇洗脱相,浓缩近干得 LbC 白色晶体。

3. 一种联苯菊酯抗原,其特征在于,由权利要求 1 所述的联苯菊酯人工半抗原 2- 甲基 -3- 苯基苄基丁二酸酯 LbC 与牛血清蛋白 BSA 偶联而成,其分子结构式为:



免疫原 LbC-BSA。

4. 用权利要求 3 所述联苯菊酯抗原制备的联苯菊酯特异性抗体。

5. 权利要求 4 所述联苯菊酯特异性抗体在检测食品、农产品和环境样品中联苯菊酯的残留量中的应用。

联苯菊酯抗原、抗体及其应用

一、技术领域

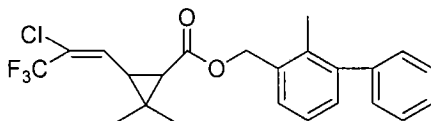
[0001] 本发明涉及一种联苯菊酯抗原、抗体及其应用,属于免疫化学分析技术领域,专用于联苯菊酯特异性抗体的制备及酶联免疫检测方法。

二、背景技术

[0002] 联苯菊酯 (bifenthrin), 商品名天王星, 1978 年美国富美实公司 (FMC) 发表了合成专利, 1988 年在中国登记, 化学名称及结构见下图, 纯品为类白色同体 mp :68 ~ 70℃, 水中的溶解度为 0.1mg/L (25℃), 在酸性条件下稳定。是拟除虫菊酯类杀虫杀螨剂, 具有胃毒和触杀作用, 持效期较长, 可用于防治农作物害虫、家庭白蚁、羊毛虫等, 是菊酯类农药中唯一能用于防治茶园害虫的药剂。

[0003] 目前对联苯菊酯的残留分析主要是气相色谱法, 该方法检测费用高, 不适合进行批量样品的快速检测。而农药残留免疫分析技术是免疫分析应用于农药残留分析领域的一门新技术, 以其简单、快速、廉价, 特别适用大批量样品检测等优点得到了全面迅速发展, 美国化学会 (AOAC) 已将免疫分析与气相色谱、液相色谱同列为农药残留检测的三大支柱技术。但到目前为止, 联苯菊酯的免疫分析方法, 国内外尚未见报道。

[0004]



[0005] 联苯菊酯的结构

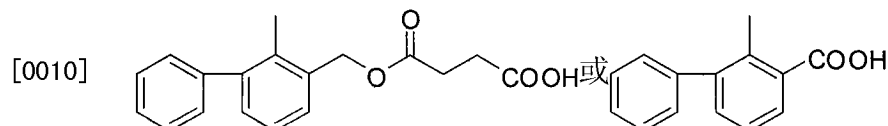
三、发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 本发明的目的是提供一种联苯菊酯特异性抗体的制备及酶联免疫分析方法。

[0008] 技术方案

[0009] 联苯菊酯人工半抗原的分子结构式为：



[0011] 2-甲基-3-苯基苄基丁二酸酯 (LBc) 2-甲基-3-苯基苯甲酸 (LBy)

[0012] 人工半抗原 2-甲基-3-苯基苄基丁二酸酯的制备方法步骤为：

[0013] 1) 取 0.5 ~ 5g 联苯醇于 100mL 三口烧瓶中, 加入 5 ~ 15mL 无水吡啶, 0.3 ~ 3g 丁二酸酐, 40 ~ 50℃ 避光磁力搅拌反应 10 ~ 12h。

[0014] 2) 反应后的混合液在 3.6% 盐酸和乙酸乙酯间进行分配, 取乙酸乙酯层。

[0015] 3) 乙酸乙酯层再用水洗, 上层过无水 Na_2SO_4 , 浓缩近干。

[0016] 4) 柱层析法纯化, 石油醚湿法装柱, 收集洗脱液为 95 : 5 的氯仿 : 甲醇洗脱相, 浓缩近干得 LBc 白色晶体。

[0017] 人工半抗原 2-甲基-3-苯基苯甲酸的制备方法步骤为：

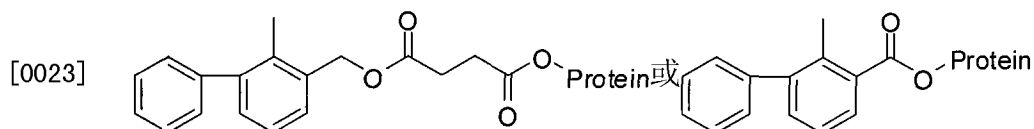
[0018] 1) 取 0.2 ~ 2g 联苯醇于 100mL 三口烧瓶中，加入 0.5 ~ 1g 18-冠醚-6，加入 15 ~ 30mL 丙酮溶解，在冰浴条件下，将 2.8g 高锰酸钾研细后的粉末分批加入，搅拌反应 5h。

[0019] 2) 将反应后的混合物抽滤，用少量丙酮洗滤饼，滤饼风干后，放入研钵内，加入适量的饱和 NaHCO_3 ，研磨，过滤除去 MnO_2 ，

[0020] 3) 滤液用浓盐酸酸化，乙醚萃取，水洗，有机相过无水 Na_2SO_4 ，浓缩近干。

[0021] 4) 柱层析法纯化，收集洗脱液为氯仿的洗脱相，浓缩得 LBy 白色晶体。

[0022] 联苯菊酯人工抗原的分子结构式为：



[0024] 免疫原 LBe-BSA 包被抗原 LBy-OVA

[0025] 人工抗原的合成

[0026] 免疫原的合成采用碳二亚胺法。将 0.2 毫摩尔的半抗原 LBe 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺中，加入 1.5 当量的二环己基碳二亚胺和 3 当量的 N-羟基琥珀酰亚胺，室温下反应过夜，离心，取上清液加入到 10 ~ 20mg/mL 的牛血清蛋白碳酸盐缓冲溶液中，搅拌反应 1 ~ 6 小时，装入透析袋，分别用蒸馏水和 0.01mol/L 的 PBS 缓冲溶液透析 3 ~ 5d，分装保存于 -20℃ 的冰箱中。

[0027] 包被抗原的合成利用混合酸酐法。分别将 0.25 毫摩尔半抗原 LBy 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺中，加入 60uL 正三丁胺和 30uL 氯甲酸丁酯，室温下反应 1 ~ 2 小时，反应液加入到 10 ~ 20mg/mL 的卵清蛋白 (OVA) 碳酸盐缓冲溶液中，搅拌反应 1 ~ 4 小时，装入透析袋，分别用蒸馏水和 0.01mol/L 的 PBS 缓冲溶液透析 3 ~ 5d，分装保存于 -20℃ 的冰箱中。

[0028] 用上述联苯菊酯抗原制备获得联苯菊酯特异性抗体，联苯菊酯特异性抗体是能与联苯菊酯发生特异性免疫反应的免疫球蛋白。它用于检测食品、农产品和环境样品（如土壤与水样）中联苯菊酯的残留量。

[0029] 有益效果 本发明通过设计合成联苯菊酯人工半抗原和人工抗原，经免疫动物产生特异性抗体，经纯化制成冻干粉后的效价为 5.12×10^5 。以抗原抗体特异性免疫学反应为基础，并引入标记物来放大显示这一反应，则可用于样本测定。其选择性取决于免疫学反应的特异性，其灵敏度取决于抗体的亲合性和标记物的可检性。

[0030] 抗体对一些类似农药的交叉反应率：氟氯氰菊酯为 1.6%，溴氰菊酯为 1.5%，氯氰菊酯、氰戊菊酯、甲氰菊酯均 < 1%。从而可知，所制备的抗体特异性较强，可快速准确地分析检测联苯菊酯在样本中的残留量。这种方法灵敏度高、特异性强，样品前处理简单，便于进行现场监控，可以与常规方法互为补充。

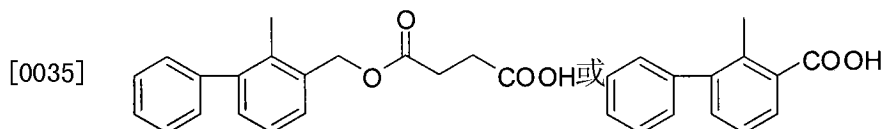
[0031] 该方法可用于环境样品中联苯菊酯的残留检测，且前处理方法较仪器分析方法简单，适合大批量筛选。该方法联苯菊酯的回收率为 82.6 ~ 104.4%，平均变异系数为 4.30 ~ 7.35%，符合残留分析标准。

四、具体实施方式

[0032] 1 联苯菊酯人工半抗原的合成

[0033] 基于 2-甲基-3-苯基苄基醇是联苯菊酯分子结构中的主要组成部分,并能使该结构特征充分暴露且含有能与蛋白质偶联的羧基,以 2-甲基-3-苯基苄基醇、丁二酸酐和无水吡啶为原料,经一步反应合成了半抗原 2-甲基-3-苯基苄基丁二酸酯(简称 LBc)。为使能通过异源反应提高检测灵敏度,以 2-甲基-3-苯基苄基醇、18-冠醚-6 和高锰酸钾为原料,合成了半抗原 2-甲基-3-苯基苯甲酸(简称 LBy)。产物 LBc 和 LBy 纯化后分别经质谱(ESI)和核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)鉴定,并与类似已知的化合物数据比较确证。

[0034] 半抗原的结构如下:



[0036] 2-甲基-3-苯基苄基丁二酸酯(LBc) 2-甲基-3-苯基苯甲酸(LBy)

[0037] 半抗原 LBc 的合成

[0038] 1) 取 0.5 ~ 5g 联苯醇于 100mL 三口烧瓶中,加入 5 ~ 15mL 无水吡啶,0.3 ~ 3g 丁二酸酐,40 ~ 50℃避光磁力搅拌反应 10 ~ 12h。

[0039] 2) 反应后的混合液在 3.6% 盐酸和乙酸乙酯间进行分配,取乙酸乙酯层。

[0040] 3) 乙酸乙酯层再用水洗,上层过无水 Na_2SO_4 ,浓缩近干。

[0041] 4) 柱层析法纯化,石油醚湿法装柱,收集洗脱液为 95 : 5 的氯仿 : 甲醇洗脱相,浓缩得 LBc 白色晶体。

[0042] 将纯化后的半抗原 LBc 分别经 ESI-MS、 $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) (Finnigan, LC-MS) 测定,以鉴定其分子结构。半抗原 LBc 的 ESI-MS 准分子离子峰为 321(M+23)。 $^1\text{H-NMR}$, δ : 7.15-7.39(m, -ArH), 5.15(s, CH_2O), 2.64(m, CH_2CH_2), 2.15(s, CH_3)。

[0043] 从以上分析综合可知,所合成的产物为目标物。

[0044] 半抗原 LBy 的合成:

[0045] 1) 取 0.2 ~ 2g 联苯醇于 100mL 三口烧瓶中,加入 0.5 ~ 1g 18-冠醚-6,加入 15 ~ 30mL 丙酮溶解,在冰浴条件下,将 2.8g 高锰酸钾研细后的粉末分批加入,搅拌反应 5h。

[0046] 2) 将反应后的混合物抽滤,用少量丙酮洗滤饼,滤饼风干后,放入研钵内,加入适量的饱和 NaHCO_3 ,研磨,过滤除去 MnO_2 ,

[0047] 3) 滤液用浓盐酸酸化,乙醚萃取,水洗,有机相过无水 Na_2SO_4 ,浓缩近干。

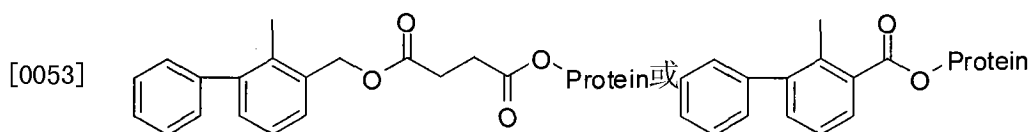
[0048] 4) 柱层析法纯化,收集洗脱液为氯仿的洗脱相,浓缩得 LBy 白色晶体。

[0049] 将纯化后的半抗原 LBy 分别经 ESI-MS、 $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) 测定,以鉴定其分子结构。半抗原 LBy 的 ESI-MS 准分子离子峰为 235(M+23), $^1\text{H NMR}$, δ : 7.25-7.62(m, -ArH), 2.49(s, CH_3)。

[0050] 从以上分析综合可知,所合成的产物为目标物。

[0051] 2. 人工抗原的合成

[0052] 人工抗原的结构式如下:



[0054] 免疫原 LBc-BSA 包被抗原 LBy-OVA

[0055] 2.1 免疫原的合成与纯化

[0056] 免疫原的合成利用碳二亚胺法。将 0.2 毫摩尔半抗原 LBc, 溶解在 1mL 的 N,N-二甲基甲酰胺中, 加入 1.5 当量的二环己基碳二亚胺和 3 当量的 N-羟基琥珀酰亚胺, 室温下反应过夜, 离心, 取上清液 100 ~ 800 μ L 缓慢加入到 4mL 10mg/mL 的牛血清蛋白 (BSA) 碳酸盐缓冲溶液中, 在磁力搅拌下反应 1 ~ 6 小时, 装入透析袋, 先用蒸馏水透析 2 ~ 4 次, 然后用 0.01mol/L 的 PBS 缓冲溶液透析 3 ~ 5d, 分装保存于 -20℃ 的冰箱中。

[0057] 2.2 包被抗原的合成与纯化

[0058] 包被抗原的合成利用混合酸酐法。将 0.25 毫摩尔半抗原 LBy 分别溶解在 1mL 的 N,N-二甲基甲酰胺中, 加入 60 μ L 正三丁胺和 30 μ L 氯甲酸丁酯, 室温下反应 1 ~ 2 小时, 反应液 100 μ L ~ 800 μ L 加入到 5mL 10mg/mL 的卵清蛋白 (OVA) 碳酸盐缓冲溶液中, 在磁力搅拌下反应 1 小时, 然后装入透析袋, 先用蒸馏水透析 3 次, 然后用 0.01mol/L 的 PBS 缓冲溶液透析 3 ~ 5d, 分装保存于 -20℃ 的冰箱中。

[0059] 2.3 人工抗原的鉴定

[0060] 按照合成联苯菊酯免疫原和包被抗原时反应物和产物的比例, 分别取反应物和产物进行紫外 (200nm ~ 400nm) 扫描。偶联物与半抗原 LBc、LBy、BSA 和 OVA 的吸收峰相比, 发生了明显的变化, 表明人工抗原 LBc-BSA 和 LBy-OVA 的合成是成功的。

[0061] 经计算半抗原与蛋白质的结合比如下:

[0062] LBc-BSA 10-40 : 1 LBy-OVA 2 ~ 10 : 1

[0063] 3. 抗体的制备

[0064] 3.1 免疫动物制备抗血清

[0065] 实验选用半周岁左右, 体重为 2-3 公斤, 健康的雄性新西兰大白兔。免疫三只兔子 (由江苏省农科院负责兔子的饲养工作), 分别编号为兔子 1-3。

[0066] 实验免疫剂量基础免疫为 0.25 ~ 4.0mg/kg, 加强免疫剂量为 0.5 ~ 4.0mg/kg, 用生理盐水分别稀释相应剂量免疫原复合物 (LBc-BSA), 加入等体积弗氏完全佐剂, 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。3 ~ 4 周后进行加强免疫, 以后每隔 2 周再次加强免疫, 加强免疫时采用弗氏不完全佐剂。从第三次免疫开始, 每次免疫后第 8 ~ 10 天, 从兔子心脏或耳缘静脉采血, 测定效价和特异性。待免疫血清效价合格后, 就进行采血。

[0067] 本实验采用心脏取血法。每只兔子可得血 80mL 左右。采血后, 先待收集在三角烧瓶中的血液凝固后, 然后用接种针沿三角烧瓶边缘将血块与玻璃脱离, 放置于 37℃ 温箱中半小时, 再放到 4℃ 冰箱中 3 ~ 4 小时, 待血块收缩后, 用吸管将血清吸入试管中, 以 3000rpm 离心 15 分钟, 分离出血清。

[0068] 3.2 抗体的纯化与鉴定

[0069] 一般采用辛酸-硫酸铵盐析法, 也可采用蛋白 A 柱层析。辛酸-硫酸铵盐析法是一个经典的方法。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, 上清液中只有 IgG。辛酸加入因抗体的来源不同而不同, 人血清为 70 μ L/mL, 兔血清为 75 μ L/mL, 小鼠血清为 40 μ L/mL, 小鼠腹水为 33 μ L/mL。这种方法 IgG 的回收率达 90% 以上。

[0070] 3.3 抗体效价测定

[0071] 免疫原复合物 (LBc-BSA) 按常规方法免疫了三只兔子。从加强免疫第二次开始,

在每次免疫后第 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。待第 4 次免疫时,兔子获得了高效价的抗体,经纯化制成冻干粉后的效价为 5.12×10^5 。

[0072] 4 联苯菊酯酶联免疫吸附测定方法建立与鉴定

[0073] 4.1 联苯菊酯 ELISA 测定方法的原理

[0074] 采用间接竞争酶联免疫分析方法。它是将农药分子与大分子载体(如蛋白质)偶联制得的复合物作为包被抗原吸附于固相载体(96 孔酶标板)上,制备成固相抗原,然后加入待测农药和相应抗体,固相抗原中的农药,待测农药,与抗体进行竞争结合反应,待测农药含量多,被结合在固相抗原上的抗体就少,反之结合在固相抗原的抗体多,反应后加入酶标二抗(只能与结合在固相抗原上的抗体相结合),最后用底物进行显色加以测定,当抗体量一定时,加入的待测农药量越多,与固相抗原结合的抗体就越少,显色反应就减弱,抑制率增高,反之,则显色反应增强,抑制率减低,因而可根据已知量农药的标准线和待检样品的抑制率,推算出待测农药的浓度。

[0075] 4.2 最佳抗体工作浓度和包被抗原复合物浓度的确定

[0076] 选择包被抗原 LBy-OVA 和抗体用方阵滴定法,同时稀释抗体和固相抗原包被液。

[0077] 在同一包被液浓度下,随着抗体的稀释,所得的 OD 值呈下降趋势,同样在同一抗体稀释浓度下,随着包被液浓度的下降,所得 OD 值也呈下降趋势。经试验,包被抗原浓度 $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,抗体浓度以 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为最适工作浓度

[0078] 4.3 标准曲线和检测灵敏度

[0079] 4.3.1 标准曲线的制备,其基本的操作步骤如下:

[0080] 4.3.1.1 包被

[0081] 1) 包被抗原溶液的配制

[0082] 从低温冰箱中取出 Q-OVA 偶联复合物,使之完全解冻后,稀释成相应工作浓度。

[0083] 2) 微量反应板的包被

[0084] 96 孔聚苯乙烯微量反应板用 PBST 洗涤后,每孔加入上面所配的抗原包被液 $100 \mu\text{L}$,于 37°C 温箱中温育 2h,弃去孔内液体,用 $300 \mu\text{L}$ PBST 溶液洗涤 5 次,拍干。

[0085] 4.3.1.2 封闭

[0086] 取出包被好的微量反应板,甩掉包被液,用 PBST 洗涤后,每孔加入 1.0% 的 OVA $200 \mu\text{L}$,于 37°C 温箱中温育 0.5h,弃去孔内液体,用 $300 \mu\text{L}$ PBST 溶液洗涤 5 次,拍干。

[0087] 4.3.1.3 点板

[0088] 1) 配制联苯菊酯的标准溶液

[0089] 取联苯菊酯标样配制 100ppm 的标准溶液,用 PBS 稀释成若干(5~8)个浓度,使每个浓度溶液中含有 30% 的甲醇。

[0090] 2) 联苯菊酯抗体稀释液的配制

[0091] 从冰箱中取出抗体,用 PBS 稀释成工作浓度。

[0092] 3) 点板

[0093] 取出经封闭的板,经 $200 \mu\text{L}$ PBST 洗涤 5 次后,每孔加入系列浓度的联苯菊酯标准液 $50 \mu\text{L}$,再加入抗体稀释液 $50 \mu\text{L}$,对照孔加入含 30% 甲醇的 PBS $50 \mu\text{L}$ 和抗体稀释液 $50 \mu\text{L}$ 。放入 37°C 温箱中温育 1h,弃去孔内液体,用 $300 \mu\text{L}$ PBST 溶液洗涤 5 次,拍干。

[0094] 4.3.1.4 加酶标二抗

[0095] 每孔加入经 1 : 2000 稀释的羊抗兔辣根过氧化物酶 PBS 溶液 100 μ L, 放入 37 $^{\circ}$ C 温箱中 1h, 弃去孔内液体, 用 200 μ l PBST 溶液洗涤 5 次, 拍干。

[0096] 4.3.1.5 显色

[0097] 每孔加入底物 OPD- 过氧化氢溶液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温箱中温育 15min, 用 50 μ L 2M H_2SO_4 终止反应。在酶联仪上测定 490nm 波长下的吸光值。根据抑制率与农药浓度之间的半对数关系作图即得到标准曲线。

[0098] ELISA 方法的标准曲线以抑制率与农药浓度的半对数曲线表示, 抑制率以下式计算:

[0099]

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\min})}{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min})} \times 100\%$$

[0100] 式中: $\text{OD}_{\max}$ 为不加药时的吸光值, OD_x 为农药 x 时的吸光值, $\text{OD}_{\min}$ 为空白对照孔的吸光值。

[0101] 由上述公式计算得联苯菊酯各浓度的抑制率, 以联苯菊酯浓度为横坐标, 抑制率为纵坐标作图。联苯菊酯在 0.01ppm ~ 50ppm 范围内, 抑制率与联苯菊酯浓度呈线性关系, 相关系数为 $r = 0.9936$ 。联苯菊酯的抑制中浓度为 2.16mg/L, 最低检测限为 0.016mg/L,

[0102] 4.4 抗体的特异性

[0103] 抗血清的特异性是指它同特异性抗原结合的能力与同该抗原类似物结合能力的比较。常用交叉反应活性作为评价的重要标准。交叉反应越小, 抗血清的特异性则越好。

[0104] 将联苯菊酯及其类似物做系列稀释, 分别与同一种抗体竞争反应, 按制 4.3 的方法制作标准曲线, 并在曲线上找出抑制率 50% 的剂量和类似物抑制率 50% 时的用量, 然后计算出各类似物的交叉反应率。

[0105] 抗体对一些类似农药的交叉反应率: 氟氯氰菊酯为 1.6%, 溴氰菊酯为 1.5%, 氯氰菊酯、氰戊菊酯、甲氰菊酯均 < 1%。

[0106] 从而可知, 所制备的抗体特异性较强。

[0107] 5 环境样品快速测定

[0108] 5.1 提取方法

[0109] 5.1.1 水样

[0110] 水样 (或经过滤) 可直接检测

[0111] 5.1.2 土壤或植物样品

[0112] (1) 称取土壤或植物样品 10g, 装入三角瓶中。

[0113] (2) 配制三个不同水平的联苯菊酯甲醇溶液。药液浓度为 10ppm、0.2ppm, 分别从中取 1mL 加入到每类样品中, 重复 3 次, 余下的作对照。

[0114] (3) 一定时间后, 在样品中加入 10mL 水和 50mL 乙腈振荡提取 1 小时。

[0115] (4) 振荡完毕后, 提取液用布氏漏斗抽滤, 将滤液倒入盛有 5g 氯化钠的具塞量筒中, 剧烈振荡, 使乙腈与水分层, 静置 10min, 取 10mL 至平底烧瓶。

[0116] (5) 用旋转蒸发器浓缩近干, 用含 30% 甲醇的 PBS 定容至 2mL。

[0117] 5.2 样品的 ELISA 法测定

[0118] 方法同标准曲线的操作。已封闭好的板每孔加入系列已知添加浓度的样品液 50 μ L, 再加入抗体稀释液 50 μ L, 对照孔加入含 30% 甲醇的 PBS 50 μ L 和抗体稀释液 50 μ L。

37℃温育 1 小时,余后步骤同 4.3.1。经分析可知,该方法的联苯菊酯回收率为 82.6 ~ 104.4%,平均变异系数为 4.30 ~ 7.35%,符合残留分析标准。该方法可用于环境样品中联苯菊酯的残留检测,且前处理方法较仪器分析方法简单,适合大批量筛选。

专利名称(译)	联苯菊酯抗原、抗体及其应用		
公开(公告)号	CN101135683B	公开(公告)日	2011-06-01
申请号	CN200710133285.6	申请日	2007-10-16
[标]申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
[标]发明人	王鸣华 施海燕 李波		
发明人	王鸣华 施海燕 李波		
IPC分类号	G01N33/53 C07C69/40 C07C63/331		
代理人(译)	张素卿		
审查员(译)	张鑫蕊		
其他公开文献	CN101135683A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种联苯菊酯抗原、抗体及其应用,属于免疫化学分析技术领域,专用于联苯菊酯特异性抗体的制备及酶联免疫检测方法。合成了半抗原2-甲基-3-苯基苄基丁二酸酯(简称LBc)和2-甲基-3-苯基苯甲酸(简称LBy),再将LBc与蛋白质偶联制备人工免疫抗原,免疫兔子获得联苯菊酯的特异性多克隆抗体,然后将LBy与蛋白质偶联制备包被抗原,最后利用合成的包被抗原和特异性抗体建立酶联免疫分析方法,联苯菊酯检测限达0.016mg/L,线性范围为0.01~50mg/kg,对大部分拟除虫菊酯及其代谢产物无明显的交叉反应。

