

[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 200810234185.7

[51] Int. Cl.

C07C 69/747 (2006.01)

C07C 235/34 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009年4月22日

[11] 公开号 CN 101412673A

[22] 申请日 2008.11.25

[21] 申请号 200810234185.7

[71] 申请人 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 张帮红

权利要求书2页 说明书8页

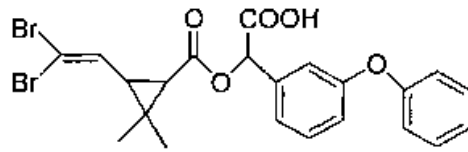
[54] 发明名称

溴氰菊酯抗原、抗体及其应用

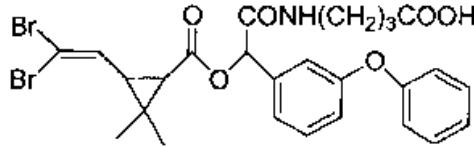
[57] 摘要

本发明公开了一种溴氰菊酯抗原、抗体及其应用,属于免疫化学分析技术领域,专用于溴氰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1-羧基-(3'-苯氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯(简称Med)和N-2-(羧基丙基)氨甲酰基-(3'-苯氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯(简称Di),再将Di与蛋白质偶联制备人工免疫抗原,免疫兔子获得溴氰菊酯的特异性多克隆抗体,然后将Med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,溴氰菊酯检测限达0.004mg/L,线性范围为0.005~100mg/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. 溴氰菊酯人工半抗原，其特征在于它的分子结构式为：



1-羧基-(3'-溴氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯 Med



或

N-2-(羧基丙基)氨基酰基-(3'-溴氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯 Di

2. 权利要求1所述溴氰菊酯人工半抗原的制备方法，其特征在于，

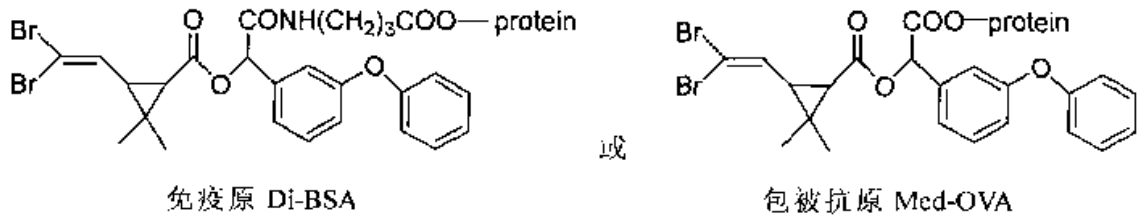
人工半抗原 1-羧基-(3'-溴氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯 Med 的制备步骤如下：

- 1) 取 0.5-5g 氰醇于 100mL 三口烧瓶中，加入 5-15mL 浓盐酸，50~70℃磁力搅拌反应 2h；
- 2) 反应后的混合液用乙醚萃取；
- 3) 乙醚层再用水洗，上层过无水 Na₂SO₄，浓缩近干，得氰酸的粗产物；
- 4) 柱层析法纯化，石油醚湿法装柱，收集洗脱液为丙酮的洗脱相，浓缩近干得无色晶体；
- 5) 称取 0.5-5g 二溴菊酸于 100mL 三口烧瓶，加入 5-15mL 氯化亚砷，搅拌回流 2h，浓缩，得黄色液体 3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基酰氯，用 15 ml THF 溶解；
- 6) 于 100 mL 三口烧瓶中加入 0.5-5g 氰酸搅拌，用 2 mol/L NaOH 溶解，将上述酰氯加入，冰浴下搅拌反应 4 h；
- 7) 用乙酸乙酯提取产物，调节 pH 值至 2.0，水洗，无水 MgSO₄干燥，减压浓缩得到 Med 粗产物；
- 8) 柱层析法纯化，用乙酸乙酯:石油醚(10:90→100:0)淋洗，浓缩得到黄色的 Med 产物。

人工半抗原 N-2-(羧基丙基)氨基酰基-(3'-溴氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯 Di 的制备步骤如下：

- 1) 称取 0.5-5g Med 于 100 mL 三口烧瓶中，加入 10 mL 氯化亚砷，搅拌回流 2h；
- 2) 减压浓缩，得黄色油状液体，用 15 mL THF 溶解并在 4℃下冷却；
- 3) 称取 0.5-5g 4-氨基丁酸于 100 mL 三口烧瓶中，加入 5 mL 的 4 mol/L NaOH 溶液，冰浴下搅拌。
- 4) 分 5 次加入酰氯的 THF 溶液，每次间隔 10 min，在后 4 次加料的同时加 2 mL 4 mol/L NaOH 加液完毕继续反应 3 h。
- 5) 用浓 HCl 调节反应液的 pH 值至 2.0，用乙酸乙酯萃取，水洗，无水 MgSO₄干燥，减压浓缩，得到黄色的油状物。
- 6) 薄层层析纯化(展开剂为:乙酸乙酯:石油醚:乙酸(30:79.5:0.5))，浓缩得到黄色 Di 产物。

3. 一种溴氰菊酯抗原，其特征在于，分别由权利要求 1 或 2 所述的半抗原 N-2-(羧基丙基)氨基甲酰基-(3'-苯氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯 Di 与蛋白质偶联、1-羧基-(3'-苯氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯 Med 与蛋白质偶联而成，其分子结构式为：



4. 用权利要求 3 所述溴氰菊酯抗原制备的溴氰菊酯特异性抗体。
5. 权利要求 4 所述溴氰菊酯特异性抗体在检测食品、农产品和环境样品中溴氰菊酯的残留量中的应用。

溴氰菊酯抗原、抗体及其应用

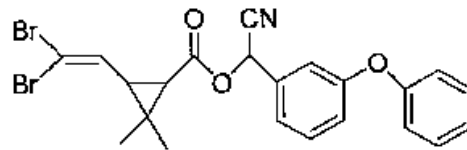
一、技术领域

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

二、背景技术

溴氰菊酯（deltamethrin）是1974年ELLIOT等人开发的合成拟除虫菊酯类杀虫剂，商品名敌杀死，化学名称及结构见下图，纯品为白色斜方形针状结晶，mp: 101~102℃，微溶于水，能溶于大多数有机溶剂，在酸性条件下稳定。具有胃毒和触杀作用，击倒快，并有拒避活性。对鳞翅目幼虫特别有效，是当代最高效的拟除虫菊酯类杀虫剂之一。

目前对溴氰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，溴氰菊酯的免疫分析方法，国内未见报道，国外有报道，但与本发明合成的半抗原结构和方法不同。



溴氰菊酯的结构

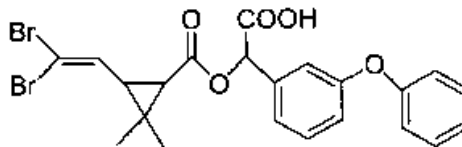
三、发明内容

技术问题

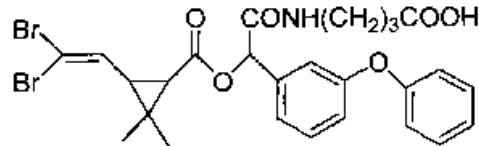
本发明的目的是提供一种溴氰菊酯特异性抗体的制备及酶联免疫分析方法。

技术方案

溴氰菊酯人工半抗原的分子结构式为：



1-羧基-(3'-苯氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯 Mod



或

N-2-(羧基丙基)氨基酰基-(3'-苯氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯 Di

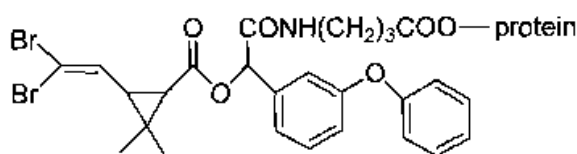
人工半抗原 1-羧基-(3'-苯氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯 Med 的制备步骤如下:

- 1) 取 0.5~5g 氰醇于 100mL 三口烧瓶中, 加入 5~15mL 浓盐酸, 50~70℃磁力搅拌反应 2h;
- 2) 反应后的混合液用乙醚萃取;
- 3) 乙醚层再用水洗, 上层过无水 Na_2SO_4 , 浓缩近干, 得氰酸的粗产物;
- 4) 柱层析法纯化, 石油醚湿法装柱, 收集洗脱液为丙酮的洗脱相, 浓缩近干得无色晶体;
- 5) 称取 0.5-5g 二溴菊酸于 100mL 三口烧瓶, 加入 5-15mL 氯化亚砷, 搅拌回流 2h, 浓缩, 得黄色液体 3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基酰氯, 用 15 mL THF 溶解;
- 6) 于 100 mL 三口烧瓶中加入 0.5-5g 氰酸搅拌, 用 2 mol/L NaOH 溶解, 将上述酰氯加入, 冰浴下搅拌反应 4 h;
- 7) 用乙酸乙酯提取产物, 调节 pH 值至 2.0, 水洗, 无水 MgSO_4 干燥, 减压浓缩得到 Med 粗产物;
- 8) 柱层析法纯化, 用乙酸乙酯:石油醚 (10:90→100:0) 淋洗, 浓缩得到黄色的 Med 产物。

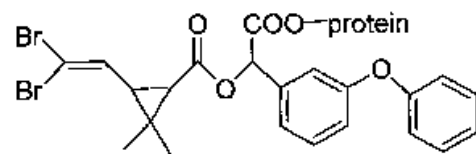
人工半抗原 N-2-(羧基丙基)氨基酰基-(3'-苯氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯 Di 的制备步骤如下:

- 1) 称取 0.5-5g Med 于 100 mL 三口烧瓶中, 加入 10 mL 氯化亚砷, 搅拌回流 2h;
- 2) 减压浓缩, 得黄色油状液体, 用 15 mL THF 溶解并在 4℃下冷却;
- 3) 称取 0.5-5g 4-氨基丁酸于 100 mL 三口烧瓶中, 加入 5 mL 的 4 mol/L NaOH 溶液, 冰浴下搅拌。
- 4) 分 5 次加入酰氯的 THF 溶液, 每次间隔 10 min, 在后 4 次加料的同时加 2 mL 4 mol/L NaOH 加液完毕继续反应 3 h。
- 5) 用浓 HCl 调节反应液的 pH 值至 2.0, 用乙酸乙酯萃取, 水洗, 无水 MgSO_4 干燥, 减压浓缩, 得到黄色的油状物。
- 6) 薄层层析纯化 (展开剂为: 乙酸乙酯:石油醚:乙酸 (30:79.5:0.5)), 浓缩得到黄色 Di 产物。

溴氯菊酯人工抗原的分子结构式为:



免疫原 Di-BSA



包被抗原 Med-OVA

人工抗原的合成

免疫原的合成采用碳二亚胺法。将 0.2 毫摩尔的半抗原 Di 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。

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 Med 溶解在 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。

用上述溴氰菊酯抗原制备获得溴氰菊酯特异性抗体，溴氰菊酯特异性抗体是能与溴氰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)中溴氰菊酯的残留量。

有益效果 本发明通过设计合成溴氰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 2.5×10^5 。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和性和标记物的可检性。

抗体对一些类似农药的交叉反应率：溴氰菊酸为 9.46%，氯氰菊酯为 4.88%，三氟氯氰菊酯、氰戊菊酯、甲氰菊酯、联苯菊酯均 <0.1%。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溴氰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。

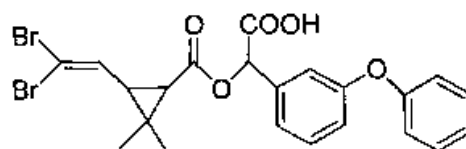
该方法可用于环境和植物样品中溴氰菊酯的残留检测，且前处理方法较仪器分析方法简单，适合大批量筛选。该方法溴氰菊酯的回收率为 75.6~106.8%，平均变异系数为 1.79~7.21%，符合残留分析标准。

四、具体实施方式

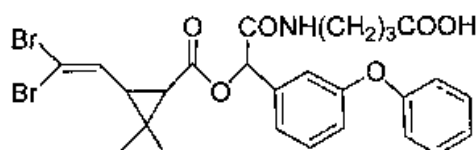
1 溴氰菊酯人工半抗原的合成

为使溴氰菊酯的立体结构特征充分暴露且含有能与蛋白质偶联的羧基，以 α -氰基-3-苯氧基苯醇、溴氰菊酸和氯化砒为原料，经三步反应合成了半抗原 1-羧基-(3'-苯氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯(简称 Med)。为使能通过异源反应提高检测灵敏度，再将半抗原 Med 与 4-氨基丁酸反应合成了 N 2-(羧基丙基)氮甲酰基-(3'-苯氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯(简称 Di)。产物 Med 和 Di 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。

半抗原的结构如下：



1-羧基-(3'-苯氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯 Med



或

N 2-(羧基丙基)氮甲酰基-(3'-苯氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯 Di

半抗原 Med 的合成

- 1) 取 0.5~5g 甙醇于 100mL 三口烧瓶中, 加入 5~15mL 浓盐酸, 50~70℃磁力搅拌反应 2h;
- 2) 反应后的混合液用乙醚萃取;
- 3) 乙醚层再用水洗, 上层过无水 Na_2SO_4 , 浓缩近干, 得甙酸的粗产物;
- 4) 柱层析法纯化, 石油醚湿法装柱, 收集洗脱液为丙酮的洗脱相, 浓缩近干得无色晶体;
- 5) 称取 0.5-5g 二溴菊酸于 100mL 三口烧瓶, 加入 5-15mL 氯化亚砷, 搅拌回流 2h, 浓缩, 得黄色液体 3-(2', 2'-二溴乙烯基)-2, 2-二甲基环丙基酰氯, 用 15 mL THF 溶解;
- 6) 于 100 mL 三口烧瓶中加入 0.5-5g 甙酸搅拌, 用 2 mol/L NaOH 溶解, 将上述酰氯加入, 冰浴下搅拌反应 4 h;
- 7) 用乙酸乙酯提取产物, 调节 pH 值至 2.0, 水洗, 无水 MgSO_4 干燥, 减压浓缩得到 Med 粗产物;
- 8) 柱层析法纯化, 用乙酸乙酯:石油醚 (10: 90→100: 0) 淋洗, 浓缩得到黄色的 Med 产物。

将纯化后的半抗原 Di 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 Med 的 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7.0-7.4 (m, -ArH), 6.82 (d, =CH), 5.90 (2×s, CHCOO), 2.15 (m, CHC), 2.05 (d, CHCO), 1.27 (m, 2× CH_3)。

从以上分析综合可知, 所合成的产物为目标物。

半抗原 LBy 的合成:

- 1) 称取 0.5-5g Med 于 100 mL 三口烧瓶中, 加入 10 mL 氯化亚砷, 搅拌回流 2h;
- 2) 减压浓缩, 得黄色油状液体, 用 15 mL THF 溶解并在 4℃下冷却;
- 3) 称取 0.5-5g 4-氨基丁酸于 100 mL 三口烧瓶中, 加入 5 mL 的 4 mol/L NaOH 溶液, 冰浴下搅拌。
- 4) 分 5 次加入酰氯的 THF 溶液, 每次间隔 10 min, 在后 4 次加料的同时加 2 mL 4 mol/L NaOH 加液完毕继续反应 3 h。
- 5) 用浓 HCl 调节反应液的 pH 值至 2.0, 用乙酸乙酯萃取, 水洗, 无水 MgSO_4 干燥, 减压浓缩, 得到黄色的油状物。
- 6) 薄层层析纯化 (展开剂为: 乙酸乙酯: 石油醚: 乙酸 (30: 79.5: 0.5)), 浓缩得到黄色 Di 产物。

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 Di 的 ESI-MS: [Found: m/z 632, $[\text{M}+\text{Na}^+]$, 1243 $[\text{2M}+\text{Na}^+]$, $\text{M}=609$], 且该峰旁有 634 和 630 两处同位素峰, 其峰高为 632 峰的 1/3 强, 由此可知该物质有 2 个溴原子。 $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3), δ 7.0-7.4 (m, 8H, -ArH), 6.53 (d, 1H, =CH), 5.98, 5.95 (2s, CHCOO), 4.72 (dd, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{N}$), 3.17 (m, CHCO), 2.22 (s, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.25, 1.24 (2s, 2× CH_3);

从以上分析综合可知, 所合成的产物为目标物。

2. 人工抗原的合成

人工抗原的结构式如下:

离心 15 分钟，分离出血清。

3.2 抗体的纯化与鉴定

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 70ul/ml，兔血清为 75ul/ml，小鼠血清为 40ul/ml，小鼠腹水为 33ul/ml。这种方法 IgG 的回收率达 90% 以上。

3.3 抗体效价测定

免疫原复合物 (Di-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 2.5×10^5 。

4 溴氰菊酯酶联免疫吸附测定方法建立与鉴定

4.1 溴氰菊酯 ELISA 测定方法的原理

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。

4.2 最佳抗体工作浓度和包被抗原复合物浓度的确定

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

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 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为最适工作浓度。

4.3 标准曲线和检测灵敏度

4.3.1 标准曲线的制备，其基本的操作步骤如下：

4.3.1.1 包被

1) 包被抗原溶液的配制

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

2) 微量反应板的包被

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。

4.3.1.2 封闭

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 OVA200

μL ，于 37°C 温箱中温育 0.5h，弃去孔内液体，用 300 μl PBST 溶液洗涤 5 次，拍干。

4.3.1.3 点板

1) 配制溴氰菊酯的标准溶液

取溴氰菊酯标样配制 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。

2) 溴氰菊酯抗体稀释液的配制

从冰箱中取出抗体，用 PBS 稀释成 1:1 作浓度。

3) 点板

取出经封闭的板，经 200 μl PBST 洗涤 5 次后，每孔加入系列浓度的溴氰菊酯标准液 50 μL ，再加入抗体稀释液 50 μL ，对照孔加入含 30% 甲醇的 PBS 50 μL 和抗体稀释液 50 μL 。放入 37°C 温箱中温育 1h，弃去孔内液体，用 300 μl PBST 溶液洗涤 5 次，拍干。

4.3.1.4 加酶标二抗

每孔加入经 1:2000 稀释的羊抗兔辣根过氧化物酶 PBS 溶液 100 μL ，放入 37°C 温箱中 1h，弃去孔内液体，用 200 μl PBST 溶液洗涤 5 次，拍干。

4.3.1.5 显色

每孔加入底物 OPD-过氧化氢溶液 100 μL ， 37°C 温箱中温育 15min，用 50 μl $2\text{M}\text{H}_2\text{SO}_4$ 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。

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：

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

式中： OD_{max} 为不加药时的吸光值， OD_x 为农药 x 时的吸光值， OD_{min} 为空白对照孔的吸光值。

由上述公式计算得溴氰菊酯各浓度的抑制率，以溴氰菊酯浓度为横坐标，抑制率为纵坐标作图。溴氰菊酯在 0.005ppm~100ppm 范围内，抑制率与溴氰菊酯浓度呈线性关系，相关系数为 $r=0.9955$ ，溴氰菊酯的抑制中浓度为 0.55mg/L，最低检测限为 0.004mg/L。

4.4 抗体的特异性

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。

将溴氰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。

抗体对一些类似农药的交叉反应率：溴氰菊酸为 9.46%，氯氰菊酯为 4.88%，三氟氯氰菊酯、氰戊菊酯、甲氰菊酯、联苯菊酯均 $<0.1\%$ 。从而可知，所制备的抗体特异性较强。

5 环境样品快速测定

5.1 提取方法

5.1.1 水样

水样（或经过滤）可直接检测

5.1.2 土壤或植物样品

（1）称取土壤或植物样品 5g，装入三角瓶中。

（2）配制三个不同水平的溴氰菊酯甲醇溶液。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。

（3）一定时间后，在样品中加入 20mL 甲醇振荡提取 0.5h。

（4）离心，取上清液，用含 30%甲醇的 PBS 稀释 3 倍，用于检测。

5.2 样品的 ELISA 法测定

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 PBS50 μ L 和抗体稀释液 50 μ L。37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时，余后步骤同 4.3.1。经分析可知，该方法的溴氰菊酯回收率为 75.6~106.8%，平均变异系数为 1.79~7.21%，符合残留分析标准。该方法可用于环境样品中溴氰菊酯的残留检测，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)	溴氰菊酯抗原、抗体及其应用		
公开(公告)号	CN101412673A	公开(公告)日	2009-04-22
申请号	CN200810234185.7	申请日	2008-11-25
[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 张帮红		
发明人	王鸣华 施海燕 张帮红		
IPC分类号	C07C69/747 C07C235/34 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种溴氰菊酯抗原、抗体及其应用，属于免疫化学分析技术领域，专用于溴氰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1-羧基-(3'-苯氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯(简称Med)和N-2-(羧基丙基)氨甲酰基-(3'-苯氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯(简称Di)，再将Di与蛋白质偶联制备人工免疫抗原，免疫兔子获得溴氰菊酯的特异性多克隆抗体，然后将Med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，溴氰菊酯检测限达0.004mg/L，线性范围为0.005~100mg/kg，对大部分拟除虫菊酯及其代谢产物无明显的交叉反应。

