

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610052531.0

[51] Int. Cl.

C07F 9/18 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 11 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 100434432C

[22] 申请日 2006.7.19

[21] 申请号 200610052531.0

[73] 专利权人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路
38 号

[72] 发明人 朱国念 刘毅华 桂文君 程敬丽
金茂俊 郭逸蓉

[56] 参考文献

synthesis of haptens of organophosphorus pesticides and development of enzyme - linked immunosorbent assays for parathion - methyl. min jung kim et al. analytica chimica acta, Vol. 493 . 2003

甲基对硫磷人工抗原的合成与鉴定. 贾明宏等. 农药学学报, 第 5 卷第 2 期. 2003

农药分子半抗原合成的研究进展. 陈林等. 现代农药, 第 4 卷第 3 期. 2005

农药人工抗原的合成研究进展. 周思祥等. 农药, 第 44 卷第 8 期. 2005

审查员 刘 芳

[74] 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司
代理人 唐银益

权利要求书 2 页 说明书 11 页

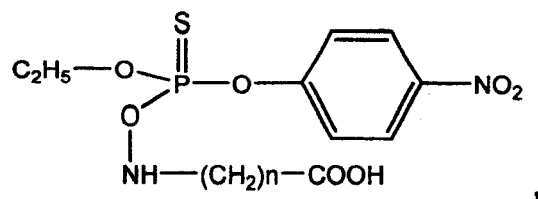
[54] 发明名称

乙基对硫磷人工半抗原、人工抗原、抗体制备法及其用途

[57] 摘要

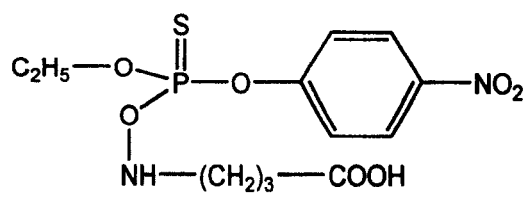
本发明公开了一种乙基对硫磷人工半抗原和一种乙基对硫磷人工抗原, 以及该种人工抗原所制成的乙基对硫磷特异性抗体。本发明的乙基对硫磷特异性抗体, 用于检测食品、农产品和环境样品中乙基对硫磷的残留量。

1、一种乙基对硫磷人工半抗原，其特征在于它的分子结构式为：

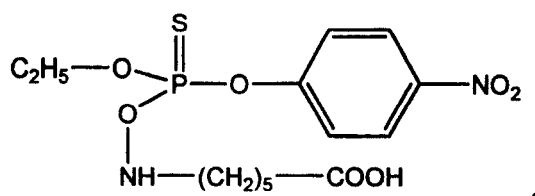


其中 $n=1\sim6$ 。

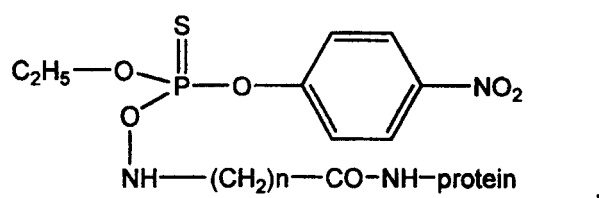
2、如权利要求1所述的乙基对硫磷人工半抗原，其特征在于 $n=3$ ，分子结构式为：



3、如权利要求1所述的乙基对硫磷人工半抗原，其特征在于 $n=5$ ，分子结构式为：

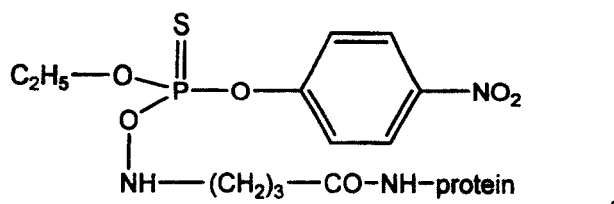


4、一种乙基对硫磷人工抗原，其特征在于它的分子结构式为：

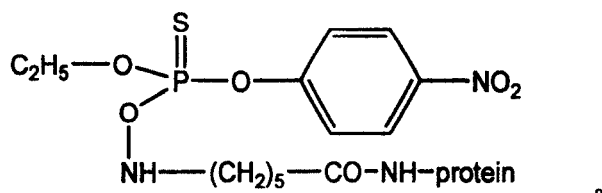


其中 $n=1\sim6$ 。

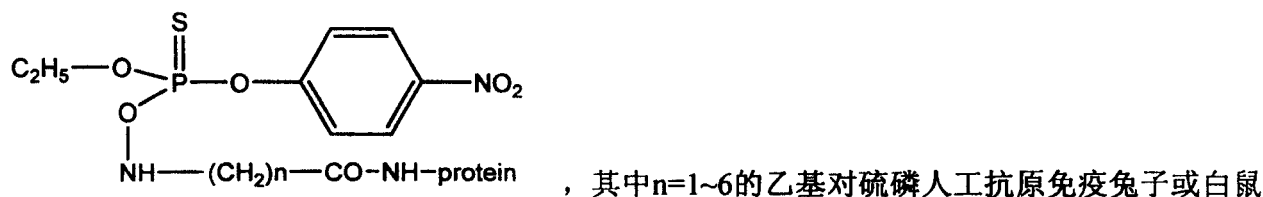
5、如权利要求4所述的乙基对硫磷人工抗原，其特征在于 $n=3$ ，分子结构式为：



6、如权利要求 4 所述的乙基对硫磷人工抗原，其特征在于 $n=5$ ，分子结构式为：



7、一种乙基对硫磷特异性抗体，其特征在于：是用分子结构式为



所得到的、能与乙基对硫磷发生特异性免疫反应的单克隆或多克隆免疫球蛋白G。

8、一种如权利要求 1~3 所述的乙基对硫磷半抗原的用途，其特征在于：是用作动物免疫的抗原体系的原料。

9、一种如权利要求 7 所述的乙基对硫磷特异性抗体的用途，其特征在于：用于检测食品、农产品和环境样品中乙基对硫磷的残留量。

10、如权利要求9所述的乙基对硫磷特异性抗体的用途，其特征在于：所述环境样品为土壤样品或水样品。

乙基对硫磷人工半抗原、人工抗原、抗体制备法及其用途

技术领域

本发明涉及一种乙基对硫磷人工半抗原、人工抗原、特异抗体制备方法及其用途，属于农药免疫化学技术领域。

背景技术

乙基对硫磷是一种应用广泛的高毒有机磷酸酯类杀虫剂，主要用于防治水稻、棉花、玉米等农作物上的多种害虫。乙基对硫磷毒性分级属高毒类，有“三致”作用。侵入途径分为：吸入、食入、经皮吸收。误食被乙基对硫磷污染的食物（包括瓜果、蔬菜、乳品、粮食以及被毒死的禽畜、水产品等），对人体健康危害极大，急性中毒表现为抑制胆碱酯酶活性，造成神经生理功能紊乱；慢性中度症状一般并不很明显，临床表现多为神经衰弱综合症，部分患者可出现毒蕈碱样和烟碱样症状，少数患者还可有屈光不正、视野缩小、色觉障碍等视觉功能损害，可有神经-肌电图改变和脑电图异常。

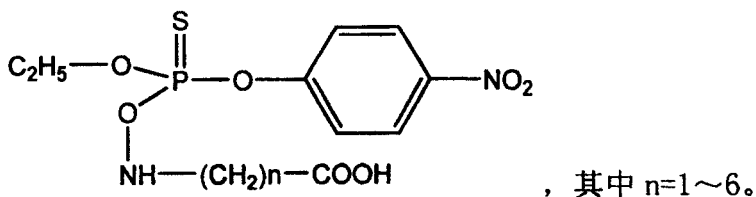
由于乙基对硫磷毒性较高，近年来已被禁止在蔬菜、水果上使用，但在农产品的进出口贸易、食品和环境安全的监督检测中，乙基对硫磷等一类高毒化合物仍然是常规检测的重要污染物。而且，乙基对硫磷与其它农药的复配也日益增多。迫切需要能够快速检测农产品中乙基对硫磷的残留量的方法，以保证人民群众的健康安全，以及我国农产品的顺利出口。

传统的检测乙基对硫磷的方法有气相色谱（GC），液相色谱（HPLC）或质谱（MS）等，样品前处理过程复杂、工作量大、仪器昂贵、要求有熟练的技术人员及较长的分析周期，而且微量的目标分析物容易丢失，难以满足大量样本和现场快速检测的需要。免疫分析为乙基对硫磷的快速残留分析提供了一个新的分析检测途径。

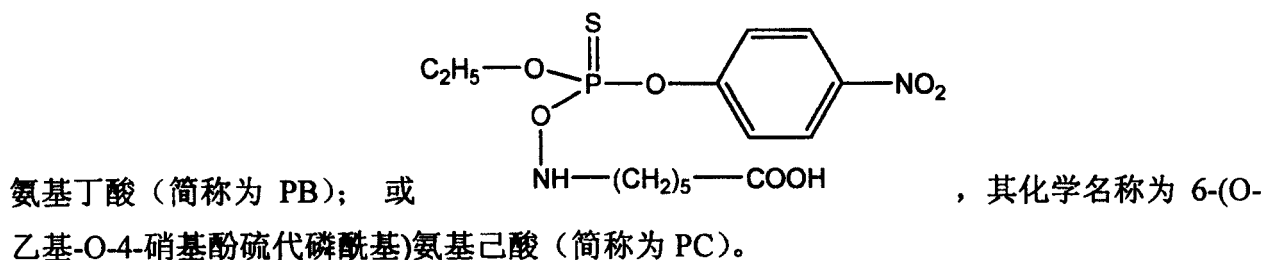
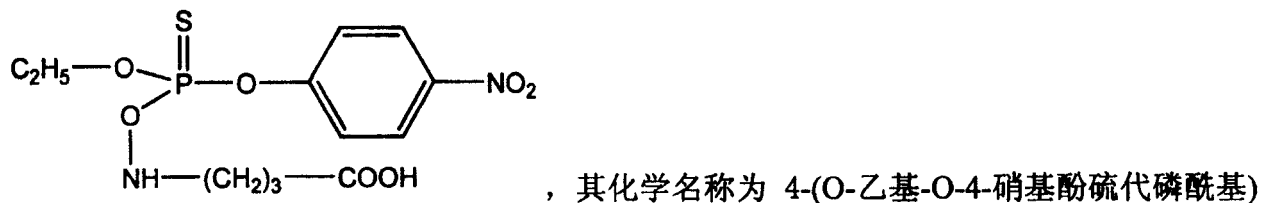
发明内容

针对现有技术中存在的不足之处，本发明提供乙基对硫磷人工半抗原、人工抗原、特异抗体制备方法及其用途，该抗体用于快速、准确检测乙基对硫磷的残留量。

本发明为达到以上目的，是通过这样的技术方案来实现的：提供一种乙基对硫磷（PA）人工半抗原，其分子结构式为：



上述乙基对硫磷人工半抗原, 优选的分子结构式为:



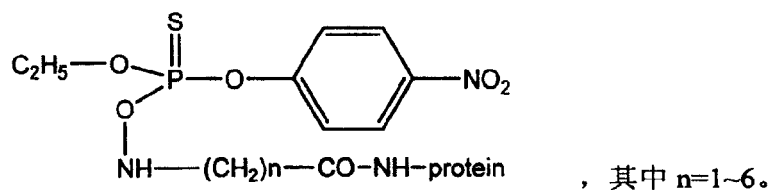
这种乙基对硫磷 (PA) 人工半抗原制备方法的步骤为:

1) 按投料比无水乙醇: 三氯硫磷为 3: 1, 在三口烧瓶中投入三氯硫磷, 冰浴下搅拌缓慢滴加无水乙醇, 加毕, 继续在 $0\sim4^{\circ}\text{C}$ 下反应 1h, 0°C 冰水洗涤, 即得产物 O-乙基硫代磷酰二氯。

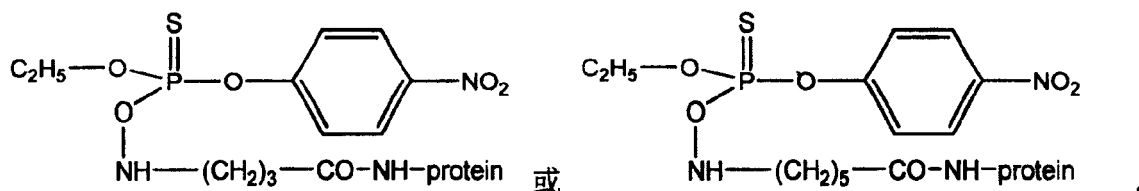
2) 按投料比三乙胺: O-乙基硫代磷酰二氯: 对硝基苯酚=6.7: 1.3: 1, 在三口烧瓶中投入三乙胺后, 再投入溶解于 20mL 乙腈的 O-乙基硫代磷酰二氯溶液, 然后加入溶解于 15mL 乙腈的对硝基苯酚溶液, 室温下搅拌反应 1h。布氏漏斗抽滤, 过无水硫酸钠, 浓缩挥发乙腈, 得淡黄色油状物。经硅胶柱层析纯化得产物 O-乙基-O-4-硝基酚硫代磷酰一氯。

3) 按投料比氢氧化钠: 氨基丁酸: O-乙基-O-4-硝基酚硫代磷酰一氯=2.5: 1.2: 1。在三口烧瓶中投入溶解于 15mL 二氧六环的 O-乙基-O-4-硝基酚硫代磷酰一氯, 加入微量催化冰浴搅拌下缓慢滴加 10mL 的氢氧化钠和氨基丁酸的混合水溶液。滴加完毕后, 升温至 20°C , 反应 4h。反应完毕后, 用 0.1mol/L 稀盐酸调节反应液 pH 值至 4.0 左右, 用氯仿 $3\times 20\text{mL}$ 提取, 合并氯仿提取液, 过无水硫酸钠, 浓缩挥发氯仿, 得淡黄色油状物。经硅胶柱层析纯化得产物 4-(O-乙基-O-4-硝基酚硫代磷酰基)氨基丁酸 (PB) 或 6-(O-乙基-O-4-硝基酚硫代磷酰基)氨基己酸 (PC)。

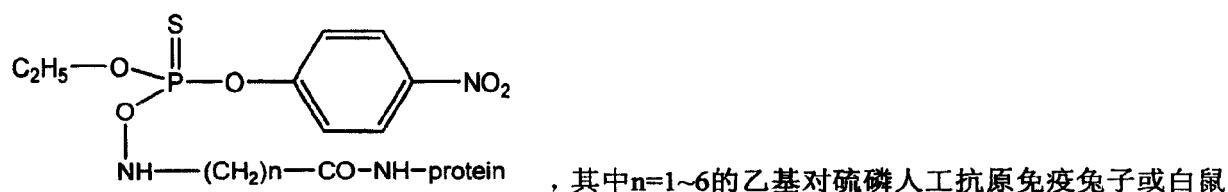
本发明还提供了一种乙基对硫磷人工抗原, 其分子结构式为:



上述乙基对硫磷人工抗原, 优选的分子结构式为:



本发明还提供了一种乙基对硫磷特异性抗体, 其是用分子结构式为



所得到的、能与乙基对硫磷发生特异性免疫反应的单克隆或多克隆免疫球蛋白G。

本发明还提供了上述乙基对硫磷半抗原的用途: 是用作动物免疫的抗原体系的原料。

本发明还提供了上述乙基对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乙基对硫磷的残留量。

作为本发明的乙基对硫磷特异性抗体的用途的改进: 环境样品为土壤样品或水样品。

本发明通过设计合成乙基对硫磷人工半抗原和人工抗原, 经免疫动物产生特异性抗体, 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。因此, 可快速准确地分析检测乙基对硫磷在样本中的残留量。这种方法灵敏度高、特异性强, 最低检测限可达 $6\mu\text{g/L}$, 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。

具体实施方式

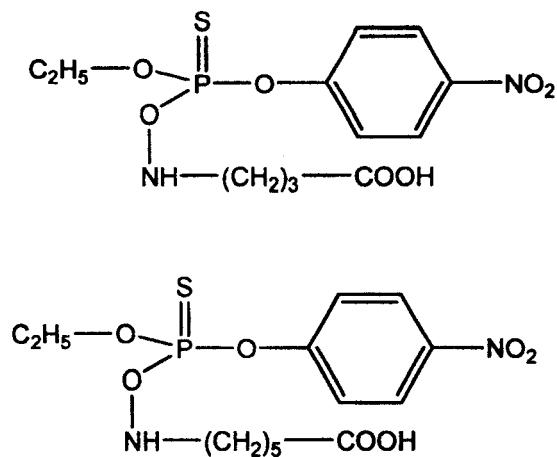
1 乙基对硫磷人工半抗原的合成

基于乙基对硫磷本身不具备能与蛋白质结合的特征基团, 必须通过引入连接臂的方法才能与蛋白质偶联免疫兔子得到抗体。

为了让半抗原的结构特征充分暴露, 可在P原子位点上接上一个连接臂。据此以三氯硫磷为起始原料, 同时以无水乙醇、对硝基苯酚, 氨基丁酸或氨基己酸等为原料, 经过三步反应, 合成了半抗原 4-(O-乙基-O-4-硝基酚硫代磷酰基)氨基丁酸(简称为PB)或 6-(O-乙基-O-4-

硝基酚硫代磷酰基)氨基己酸(简称为 PC)。产物 PB 和 PC 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。

主要半抗原的结构如下:



2 人工抗原的合成

免疫原的合成采用碳二亚胺法。将 0.2mmol 的半抗原 PB(或 PC)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。将 0.25 毫摩尔半抗原 PB(或 PC)溶解在 N, N-二甲基甲酰胺中,加入 60 μL 正三丁胺和 30 μL 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。

按照合成乙基对硫磷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)分析。偶联物与半抗原 PB、PC、BSA 和 OVA 的吸收峰相比,发生了明显的变化,表明人工抗原 PB-BSA、PB-OVA、PC-BSA、PC-OVA 的合成是成功的。

经计算半抗原与蛋白质的结合比如下:

PB-BSA	10~30:1	PC-BSA	15~30:1
PB-OVA	2~10:1	PC-OVA	3~8:1

3 抗体的制备及乙基对硫磷酶联免疫分析方法的建立

两种免疫原复合物(PB-BSA、PC-BSA)按常规方法各免疫了三只兔子。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分别为 2.2×10^6 、

1.8×10^6 。

利用乙基对硫磷抗原抗体免疫反应和酶促反应建立乙基对硫磷酶联免疫分析法。在检测分析蔬菜与水果等样品中乙基对硫磷残留时具有很高的特异性和灵敏度，与类似化合物的交叉反应率低，同时操作简单快速，不需要复杂的前处理过程，一次可同时检测大批样品，成本低廉，对操作人员的要求低，便于进行现场监控，可以与常规方法互为补充。

实施例 1、半抗原 PB 的合成

1) 将三氯硫磷 80.0g (0.46mol) 装入三口烧瓶中，磁力搅拌，冰浴下 -5°C 时开始缓慢滴加无水乙醇 79.35mL (1.38mol)，加毕，继续在 $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ 下反应 1h， 0°C 冰水洗涤产物，过无水硫酸钠，即得产物 O-乙基硫代磷酰二氯。

2) 按投料比三乙胺：O-乙基硫代磷酰二氯：对硝基苯酚=6.7：1.3：1，在三口烧瓶中投入三乙胺 20g 后，O-乙基硫代磷酰二氯 6.23g (27.8mmol) 溶解于 20mL 乙腈，对硝基苯酚 3.0g (21.6mmol) 溶解于 15mL 乙腈中，两种溶液一起转入三口烧瓶中，室温下搅拌反应 1h。布氏漏斗抽滤，过无水硫酸钠，浓缩挥发乙腈，得淡黄色油状物。经硅胶柱层析纯化得产物 O-乙基-O-4-硝基酚硫代磷酰一氯。

3) 按投料比氢氧化钠：氨基丁酸：O-乙基-O-4-硝基酚硫代磷酰一氯=2.5：1.2：1。在三口烧瓶中投入 O-乙基-O-4-硝基酚硫代磷酰一氯 3.16g (11.25mmol) 溶解于 15mL 二氧六环，加入微量催化剂。氢氧化钠 1.13g (28.13mmol) 与 1.27g (12.38mmol) 氨基丁酸配成 10mL 的混合水溶液。冰浴搅拌下缓慢滴加此混合水溶液至三口反应瓶中。滴加完毕后，升温至 20°C ，反应 4h。反应结束后，用 0.1mol/L 稀盐酸调节反应液 pH 值至 4.0 左右，用氯仿 $3 \times 20\text{mL}$ 提取，合并氯仿提取液，过无水硫酸钠，浓缩挥发氯仿，得淡黄色油状物。经硅胶柱层析纯化得产物 4-(O-乙基-O-4-硝基酚硫代磷酰基)氨基丁酸 (PB)。

取上述合成的产物分别经 ESI、 $^1\text{H-NMR}$ 和 IR 测定其分子结构。该物质的 ESI 分子离子峰为 349 $[\text{M-H}]^-$ ，由此可知该物质，分子量为 348。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 为： δ 8.23 (2H, d, $J=8.8$, ArH), 7.37 (2H, d, $J=8.0$, ArH), 4.21 (2H, m, CH_2OP), 3.40 (1H, m, NH), 3.18 (2H, m, CH_2NH), 2.47 (2H, m, CH_2COOH), 1.87 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.38 (3H, t, $J=6.8$, CH_3)。

从以上分析综合可知，所合成的产物为目标物。

实施例 2、半抗原 PC 的合成

1) 将三氯硫磷 80.0g (0.46mol) 装入三口烧瓶中，磁力搅拌，冰浴下 -5°C 时开始缓慢滴加无水乙醇 79.35mL (1.38mol)，加毕，继续在 $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ 下反应 1h， 0°C 冰水洗涤产物，过无水硫酸钠，即得产物 O-乙基硫代磷酰二氯。

2) 按投料比三乙胺：O-乙基硫代磷酰二氯：对硝基苯酚=6.7：1.3：1，在三口烧瓶

中投入三乙胺 20g 后，O-乙基硫代磷酰二氯 6.23g (27.8mmol) 溶解于 20mL 乙腈，对硝基苯酚 3.0g (21.6mmol) 溶解于 15mL 乙腈中，两种溶液一起转入三口烧瓶中，室温下搅拌反应 1h。布氏漏斗抽滤，过无水硫酸钠，浓缩挥发乙腈，得淡黄色油状物。经硅胶柱层析纯化得产物 O-乙基-O-4-硝基酚硫代磷酰一氯。

3)按投料比氢氧化钠：氨基丁酸：O-乙基-O-4-硝基酚硫代磷酰一氯=2.5：1.2：1。在三口烧瓶中投入 O-乙基-O-4-硝基酚硫代磷酰一氯 2.88g (10.23mmol) 溶解于 15mL 二氧六环中，加入微量催化剂。氢氧化钠 1.02g (25.58mmol) 与 1.61g (12.28mmol) 氨基己酸配成 10mL 的混合水溶液。冰浴搅拌下缓慢滴加此混合水溶液至三口反应瓶中。滴加完毕后，升温至 20℃，反应 4h。反应结束后，用 0.1mol/L 稀盐酸调节反应液 pH 值至 4.0 左右，用氯仿 3×20mL 提取，合并氯仿提取液，过无水硫酸钠，浓缩挥发氯仿，得淡黄色油状物。经硅胶柱层析纯化得产物 6-(O-乙基-O-4-硝基酚硫代磷酰基)氨基己酸 (PC)。

取上述合成的产物分别经 ESI、¹H-NMR 和 IR 测定其分子结构。该物质的 ESI 分子离子峰为 377 [M-H]⁻，由此可知该物质，分子量为 376。¹H-NMR (CDCl₃) 为：δ 8.24 (2H, d, J=8.8, ArH), 7.38 (2H, d, J=8.8, ArH), 4.20 (2H, q, CH₂OP), 3.41 (1H, s, NH), 3.10 (2H, m, CH₂NH), 2.38 (2H, m, CH₂COOH), 1.41~1.67 (6H, m, 3×CH₂), 1.39 (3H, m, CH₃)。

从以上分析综合可知，所合成的产物为目标物。

实施例 3、人工抗原的合成

3.1 免疫原的合成与纯化

免疫原的合成利用碳二亚胺法。将 0.2mmol 半抗原 PB，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 100~800μL 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。

3.2 包被抗原的合成与纯化

包被抗原的合成利用混合酸酐法。将 0.25mmol 半抗原 PB 溶解在 1mL 的 N, N-二甲基甲酰胺中，加入 60μL 正三丁胺和 30μL 氯甲酸丁酯，室温下反应 1~2 小时，反应液 100μL~800μL 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。

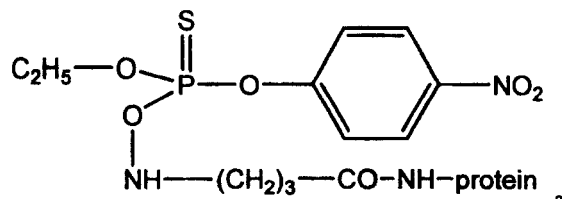
3.3 人工抗原的鉴定

按照合成乙基对硫磷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。

经计算半抗原与蛋白质的结合比如下：



因此，所得人工抗原为



实施例 4、人工抗原的合成

4.1 免疫原的合成与纯化

免疫原的合成利用碳二亚胺法。将 0.2mmol 半抗原 PC，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 100~800μL 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。

4.2 包被抗原的合成与纯化

包被抗原的合成利用混合酸酐法。将 0.25mmol 半抗原 PC 溶解在 1mL 的 N，N-二甲基甲酰胺中，加入 60μL 正三丁胺和 30μL 氯甲酸丁酯，室温下反应 1~2 小时，反应液 100μL~800μL 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。

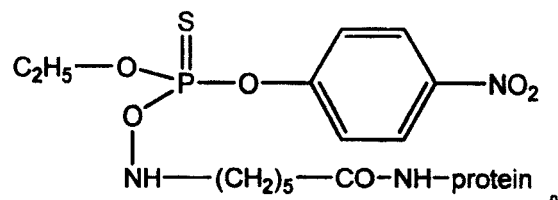
4.3 人工抗原的鉴定

按照合成乙基对硫磷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。

经计算半抗原与蛋白质的结合比如下：



因此，所得人工抗原为



实施例 5、抗体的制备

5.1 免疫动物制备抗血清

实验选用半周岁左右,体重为 2—3 公斤,健康的雄性家兔。每种免疫原免疫三只兔子(由浙江省中医学院负责兔子的饲养工作),分别编号为兔子 1—6。

实验免疫剂量基础免疫为 1.0mg/kg (以兔子体重计),加强免疫剂量为 1.5mg/kg。用生理盐水分别稀释适量人工抗原复合物,加入等体积弗氏完全佐剂充分乳化,直至滴入冷水中乳滴不分散。末免用生理盐水稀释免疫原直接用于免疫。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。

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。

5.2 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 70μl/ml,兔血清为 75μl/ml,小鼠血清为 40μl/ml,小鼠腹水为 33μl/ml。这种方法 IgG 的回收率达 90%以上。

5.3 抗体效价测定

两种免疫原复合物(PB-BSA、PC-BSA)按常规方法各免疫了三只兔子。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分别为 2.2×10^6 、 1.8×10^6 。

实施例 6、乙基对硫磷酶联免疫吸附测定方法建立与鉴定

6.1 乙基对硫磷 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。

6.2 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 PB-BSA、抗 PB-BSA 抗体和抗 PC-BSA 抗体用方阵滴定法, 同时稀释抗体和固相抗原包被液。

6.3 标准曲线和检测灵敏度

6.3.1 标准曲线的制备, 其基本的操作步骤如下:

6.3.1.1 包被

1) 包被抗原溶液的配制

从低温冰箱中取出 PB-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 μ L, 于 37°C 温箱中温育 2h。

6.3.1.2 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 2.0% 的脱脂奶 200 μ L, 于 37°C 温箱中温育 0.5h。

6.3.1.3 点板

1) 配制乙基对硫磷的标准溶液

取乙基对硫磷标样配制 100ppm 的标准溶液, 从中取出 200 μ L, 待溶剂甲醇挥发后, 加入 2mL PBS 溶液, 使之成 10ppm 溶液, 稀释成若干 (5~8) 个浓度。

2) 乙基对硫磷抗体稀释液的配制

从冰箱中取出已经配制成适当浓度的抗体 (抗 PB-BSA 抗体或抗 PC-BSA 抗体), 用 PBS 稀释成工作浓度。

3) 点板

取出经封闭的板, 经 200 μ l PBST 洗涤 3 次后, 每孔加入系列浓度的乙基对硫磷标准液 50 μ L, 再加入抗体稀释液 50 μ L, 对照孔加入 PBS 50 μ L 和抗体稀释液 50 μ L。放入 37°C 温箱中温育 1h, 弃去孔内液体, 用 200 μ l PBST 溶液洗涤 3 次。

6.3.1.4 加酶标二抗

每孔加入经 1: 1000 稀释的羊抗兔辣根过氧化物酶 PBS 溶液 100 μ L, 放入 37°C 温箱中 1 小时, 用 PBST 溶液洗涤 3 次, 甩干。

6.3.1.5 显色

每孔加入底物 OPD-过氧化氢溶液 100 μ L, 37°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。

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。

6.4 抗体的特异性

抗血清的特异性就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。

将乙基对硫磷及其类似物做系列稀释，分别与同一种抗体竞争反应，按制 6.3 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。

实施例 7、水稻样品快速测定

7.1 提取方法

7.1.1 水样

水样（或经过滤）可直接检测。

7.1.2 土壤和植物（水稻）样品

（1）可分别称取土壤样品、稻米（将稻米和稻壳分离，并捣碎）、水稻稻秆（剪成<1cm 长）或其它植物样品，各 10g，装入三角瓶中。

（2）配制三个不同水平的乙基对硫磷甲醇溶液。药液浓度为 10ppm、1ppm、0.1ppm，分别从中取 1mL 加入到每类样品中，重复 2 次，余下的作对照。

（3）一定时间后，在样品中加入 50mL 的甲醇放在国际型振荡器上振荡提取 30 分钟。

（4）振荡完毕后，提取液用布氏漏斗抽滤，用 30mL 的甲醇冲洗滤渣，抽滤完毕后，移入到 250mL 的容量瓶中。

（5）用旋转蒸发器浓缩至 2mL 左右，用 PBS 定容至 10mL。

即以上的样品为添加进已知量的乙基对硫磷标准样品。

7.2 样品的 ELISA 法测定

已包被好的板每孔加入系列已知添加浓度的样品液 50 μL，再加配制好的抗体溶液 50 μL，对照孔加入 100 μL 抗血清，盖好板，37℃温育 1 小时，弃去孔内液体，其余步骤同实施例 6 中的 6.3。

样品测定结果如表 1 所示：

表1 乙基对硫磷的样品添加回收率测定结果

样品	添加浓度 (ng/ml)	回收率 ^a (%)	变异系数 (C.V.%)
池塘水	10	103.8	16.0
	100	97.5	12.4
自来水	10	113.6	9.1
	100	107.3	9.7
黄红壤	10	106.1	27.6
	100	94.4	14.2
稻 米	10	88.5	17.4
	100	93.2	11.1
稻 秆	10	74.5	26.5
	100	86.6	21.7

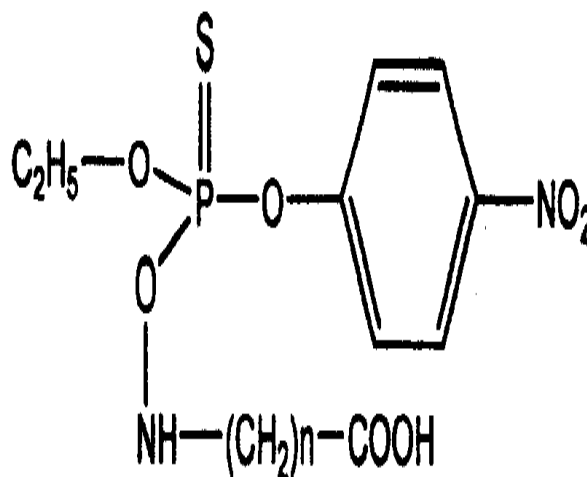
按照本方法检测样品最终所得的结论是：用该方法检测水样、植物样品或土壤样品，灵敏度高，定性定量准确，测定简便快速，检测成本低。

最后，还需要注意的是，以上列举的仅是本发明的若干个具体实施例。显然，本发明不限于以上实施例，还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形，均应认为是本发明的保护范围。

专利名称(译)	乙基对硫磷人工半抗原、人工抗原、抗体制备法及其用途		
公开(公告)号	CN100434432C	公开(公告)日	2008-11-19
申请号	CN200610052531.0	申请日	2006-07-19
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	朱国念 刘毅华 桂文君 程敬丽 金茂俊 郭逸蓉		
发明人	朱国念 刘毅华 桂文君 程敬丽 金茂俊 郭逸蓉		
IPC分类号	C07F9/18 C07K16/18 G01N33/53		
审查员(译)	刘芳		
其他公开文献	CN1900086A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种乙基对硫磷人工半抗原和一种乙基对硫磷人工抗原，以及该种人工抗原所制成的乙基对硫磷特异性抗体。本发明的乙基对硫磷特异性抗体，用于检测食品、农产品和环境样品中乙基对硫磷的残留量。



,