



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101289463 B

(45) 授权公告日 2012.04.25

(21) 申请号 200810062154.8

G01N 33/53(2006.01)

(22) 申请日 2008.06.03

审查员 李宗韦

(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 刘毅华 赵金浩 王春梅 郭逸蓉
桂文君 程敬丽 朱国念

(74) 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公
司 33212

代理人 金祺

(51) Int. Cl.

C07F 9/24(2006.01)

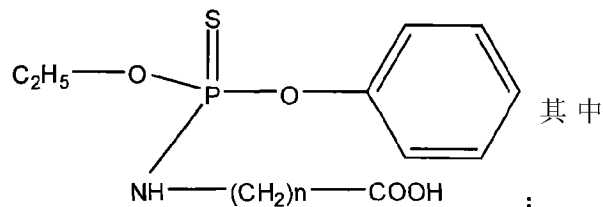
权利要求书 1 页 说明书 12 页

(54) 发明名称

一种乙基对硫磷竞争半抗原和竞争原及其用途

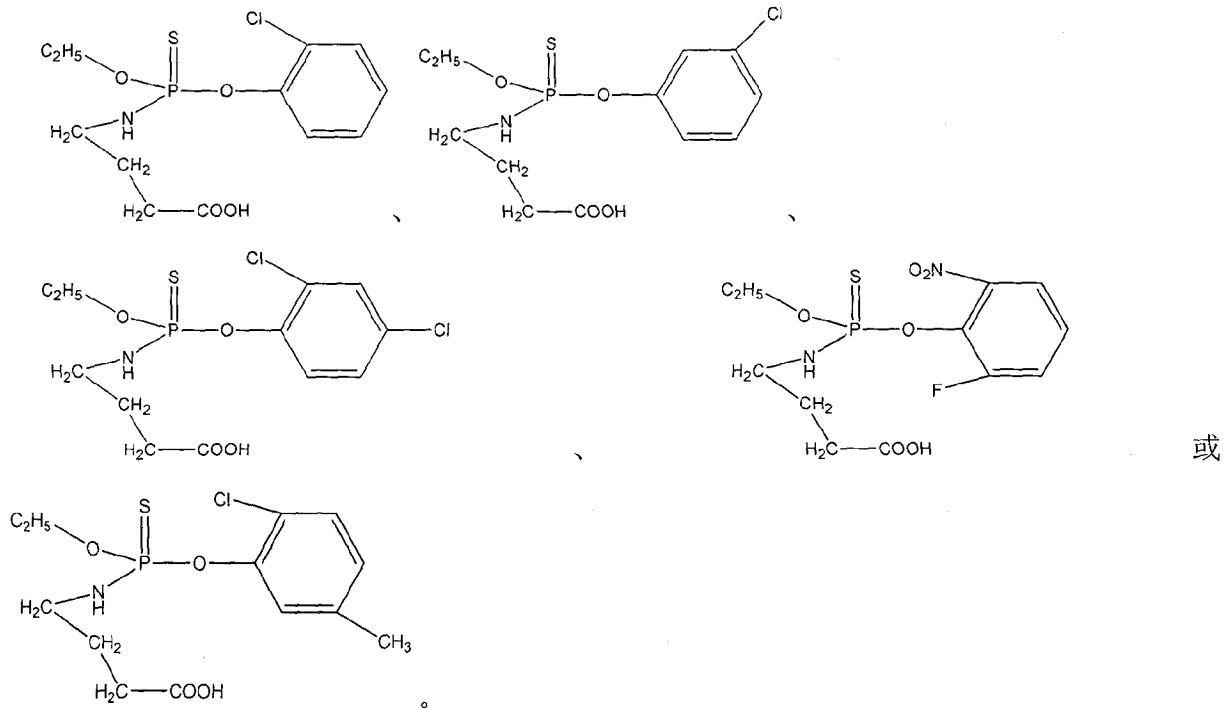
(57) 摘要

本发明公开了一种乙基对硫磷竞争半抗原，其分子结构式为：



n = 1 ~ 6, R 为以 1 个、2 个或两两之间组合的形式存在于苯环上的原子或基团。本发明还同时提供了利用上述乙基对硫磷竞争半抗原所制成的乙基对硫磷竞争原。本发明还同时提供了利用上述乙基对硫磷竞争原和免疫原 PB-BSA 所建立的异源 ELISA 分析方法,能用于检测食品、农产品和环境样品中乙基对硫磷的残留量。

1. 一种乙基对硫磷竞争半抗原,其特征分子结构式为:



一种乙基对硫磷竞争半抗原和竞争原及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种乙基对硫磷竞争半抗原和竞争原的结构及其用途,属于农药免疫化学技术领域。

背景技术

[0002] 分子量小于 1000 道尔顿的小分子有毒化学品如农药及其代谢产物,其传统的残留分析方法主要是依靠气相色谱 (GC)、液相色谱 (HPLC)、气质联用 (GC/MS) 或液质联用 (HPLC/MS) 等理化分析手段。但仪器分析方法具有前处理步骤繁琐、溶剂消耗量大、耗时长等缺点,难以满足对大量样品进行低成本快速筛选的需要。因此人们迫切希望有一种简单、快速、灵敏及价廉的检测技术能在野外和实验室内进行大批量的筛选试验;免疫化学分析技术正是由于具备这些优点,已成为最有应用价值和发展潜力的痕量分析技术之一。目前这一技术已经成为农药残留痕量分析研究的一个崭新领域,被列为当前优先研究、开发和利用的农药残留分析技术,世界粮农组织 (FAO) 已向许多国家推荐此项技术,美国 EPA 将免疫分析技术与气相色谱、液相色谱共同列为农药残留分析的支柱技术。

[0003] 免疫分析方法根据其检测原理又可分为竞争法和非竞争法。竞争法由于比非竞争法具有灵敏度高和抗基质干扰能力强的优点,而应用最为广泛。竞争免疫分析方法根据其包被原或酶标半抗原结构与免疫半抗原结构的异同,又可分为同源免疫分析 (Homologous Assays) 和异源免疫分析 (Heterologous Assays) 方法。同源分析,即用同一种半抗原制备的人工抗原与相应的抗体进行免疫分析,也是目前在农药和兽药的免疫化学分析方法中及其试剂盒开发中最常用的方法。同源分析由于免疫半抗原和免疫分析中使用的包被原或酶标半抗原均采用同一种半抗原,经不同偶联方法与不同蛋白质 (BSA、OVA、KLH 等) 连接,半抗原合成数量较少,省时省力。但是同源分析对基质效应的抗干扰能力弱,对实际环境样品的检测常因有基质影响而出现方法灵敏度低。而且,目前免疫化学分析方法发展遇到的最大“瓶颈”问题就是同源分析中小分子农药与抗原相比对抗体的竞争力低,以及应用于实际环境样品分析时往往因为基质效应而出现灵敏度大大下降,最终致使免疫方法与仪器检测能力有一定差距,导致免疫化学分析方法在实际中的应用受到限制。这也是困扰农药快速检测技术进行商业化转化 (如开发快速检测试剂盒、金标试纸等产品) 所面临的最为关键的问题。而异源分析则能增加小分子农药对抗体的竞争力,增强方法对基质效应的抗干扰性,大大提高方法的灵敏度。另外,异源分析还具有提高方法特异性、增加抗体用途、通过改变包被原和免疫半抗原的组合发展多残留检测方法等优点。

[0004] 异源分析,是指用同一种分析物的不同半抗原所得的抗体分别与不同半抗原所制备的包被原或标记抗原进行的免疫分析。其中,采用与免疫半抗原不同的半抗原即是竞争半抗原,包括包被半抗原与酶标半抗原。目前,异源分析技术发展还多注重在证明异源分析的优越性和发展不同农药的异源分析测定方法上,对竞争半抗原合理设计的研究还属于起步阶段。与免疫半抗原设计不同的是,免疫半抗原设计的目的是为了设计能与目标物最大程度相似的半抗原从而得到高特异性的抗体,而最佳竞争半抗原的设计要求不仅是要与目

标物不相似,同时还需要与免疫半抗原不相似,因此需要满足两方面的要求,而且不相似的设计空间更大,设计难度也随之增加。

[0005] 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、水产品以及被毒死的禽畜等),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;因此迫切需要能够快速检测农产品中乙基对硫磷残留量的方法,以保证人民群众的健康安全,以及我国农产品的顺利出口。

[0006] 传统的乙基对硫磷检测方法有气相色谱(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。前人有建立同源免疫分析方法应用于乙基对硫磷的残留检测,但是由于免疫原结构对抗原决定簇改变太多,而导致抗体亲和力低、特异性差,而且同源分析抗基质干扰能力差,导致建立的同源免疫分析方法很难应用于实际环境样品和农产品的检测,这也是没有成熟的乙基对硫磷商品化试剂盒面世的主要原因。而异源免疫分析方法的优点(尤其是其抗基质干扰效应的优势)使之成为解决这个问题的很好手段。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是提供一种能够建立高灵敏度、高特异性的异源免疫分析方法的竞争半抗原和竞争原,还提供了其用途。

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种乙基对硫磷竞争半抗原,其分子结构式为:

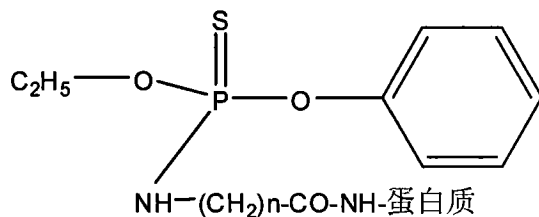


之间组合的形式存在于苯环上的原子或基团。也就是说:该类原子或基团以邻位、对位或间位的形式位于苯环上。

[0010] 作为本发明的乙基对硫磷竞争半抗原的改进:原子为 F、Cl 或 Br;基团为 OCH₃、CH₃、C₂H₅、NO₂ 或 C(CH₃)₃。

[0011] 本发明还同时提供了一种利用上述乙基对硫磷竞争半抗原所制成的乙基对硫磷竞争原,其分子结构式为:

[0012]

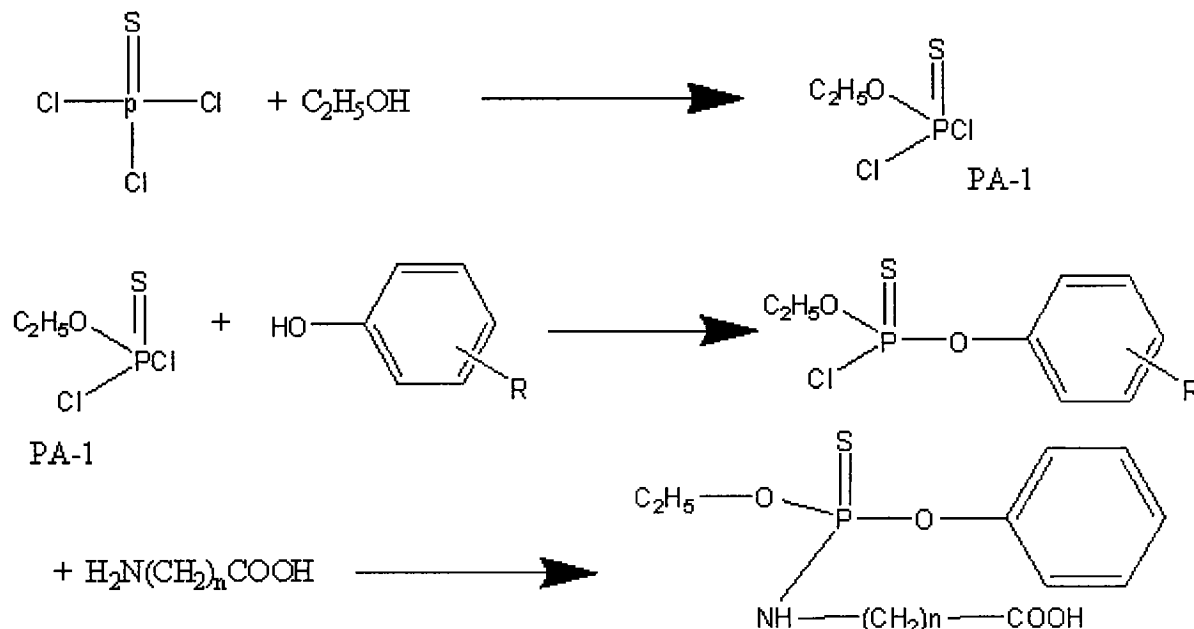


[0013] 本发明还同时提供了一种利用上述乙基对硫磷竞争原和免疫原 PB-BSA 所建立的异源 ELISA 分析方法,其特征在于:用于检测食品、农产品和环境样品中乙基对硫磷的残留量。

[0014] 本发明是针对现有技术中同源分析的不足之处,设计了一种乙基对硫磷竞争半抗原及相应的乙基对硫磷竞争原,其能用作动物免疫的抗原体系的原料。

[0015] 本发明的乙基对硫磷竞争半抗原以三氯硫磷为起始原料,先与无水乙醇反应生成 O-乙基硫代磷酰二氯,再与苯酚类化合物生成反应中间体硫代磷酰一氯,最后与氨基酸反应生成竞争半抗原。反应式如下:

[0016]



[0017] 其中 $n = 1 \sim 6$; R 表示 F、Cl、Br、OCH₃、CH₃、C₂H₅、NO₂、C(CH₃)₃ 等原子和基团以 1 个、2 个或两两之间组合的形式存在与苯环上(邻位、对位、间位)。

[0018] 本发明提出的乙基对硫磷竞争半抗原,主要是针对抗原决定簇部位进行改变,从而减少抗体与竞争原之间的亲和力,增加免疫分析中抗体对乙基对硫磷的识别能力和效率,从而提高方法的灵敏度。目前报道的有关乙基对硫磷的 ELISA 分析方法对标样的最低检测限(IC₁₀)大多为 2-50ng/mL 之间,但建立的 ELISA 方法应用于实际农产品和环境样品检测的报道不多,已有报道中最低检出浓度大多为 100ng/mL-1000ng/mL 之间,而目前各国对乙基对硫磷的残留限量标准大多为 10ng/mL,因此目前已有的 ELISA 方法还不能适应于大规模快速筛选的要求,还不能发挥 ELISA 快速简便的优势。本申请人于 2006.07.19 申请的发明专利《乙基对硫磷人工半抗原、人工抗原、抗体制备法及其用途》(申请号:200610052531.0)告知最低检测限为 6ng/mL。

[0019] 而本发明建立的异源 ELISA 方法对乙基对硫磷标样的最低检测限 (IC_{10}) 可达 0.1 ng/mL (0.0001 mg/kg), 与其它有机磷农药的交叉反应率都很低, 对农产品和环境样品中乙基对硫磷残留的最低检出浓度为 1 ng/mL (水、土), 5 ng/mL (黄瓜、大米、玉米), 说明方法灵敏度和特异性高, 而且能够应用于实际农产品和环境样品的农药残留检测。

[0020] 综上所述, 本发明可用于快速检测样本中痕量的乙基对硫磷残留物, 该方法灵敏度高、特异性强、样品前处理简单、便于进行现场监控等优点, 可以与常规方法互为补充; 且为建立能够应用于农产品和环境样品中乙基对硫磷残留分析的异源竞争免疫分析方法奠定基础。

具体实施方式

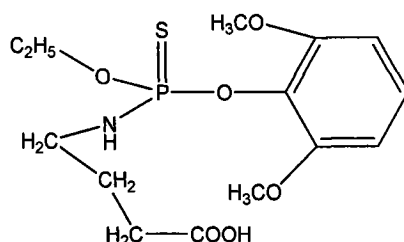
[0021] 实施例 1、竞争半抗原 H1 的合成:

[0022] 1)、将三氯硫磷 80.0 g (0.46 mol) 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 79.35 mL (1.38 mol), 加毕, 继续在 0°C 下反应 1 小时, 0°C 冰水洗涤产物, 过无水硫酸钠, 即得产物 0-乙基硫代磷酰二氯。

[0023] 2)、按三乙胺: 0-乙基硫代磷酰二氯: 2,6-二甲氧基苯酚 = $6.7 : 1.3 : 1$ (摩尔比) 的投料比, 在三口烧瓶中投入三乙胺 20 g 后; 将 0-乙基硫代磷酰二氯 6.55 g 溶解于 20 mL 乙腈, 得溶液 I; 将 2,6-二甲氧基苯酚 1.17 g 溶解于 15 mL 乙腈中, 得溶液 II; 将溶液 I 和溶液 II 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 0-乙基-0-4-(2,6-二甲氧基苯酚) 硫代磷酰一氯。

[0024] 3)、按氢氧化钠: 氨基丁酸: 0-乙基-0-4-(2,6-二甲氧基苯酚) 硫代磷酰一氯 = $2.5 : 1.2 : 1$ (摩尔比) 的投料比, 在三口烧瓶中投入 0-乙基-0-4-(2,6-二甲氧基苯酚) 硫代磷酰一氯 4.16 g 溶解于 15 mL 二氧六环。 1.33 g 氢氧化钠、 1.50 g 氨基丁酸加水后配成 10 mL 的混合水溶液。冰浴搅拌下缓慢滴加此混合水溶液至三口烧瓶中。滴加完毕后, 升温至 20°C , 反应 4 小时。反应结束后, 用 0.1 mol/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 H1, 结构见下:

[0025]



[0026] 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。 $^1\text{H-NMR}$ 结果如下: δ 6.89 (1H, s, ArH), 6.61 (2H, d, $J = 7.2$, ArH), 6.96 (1H, d, $J = 4.4$, ArH), 4.12 (2H, m, CH_2OP), 3.89 (6H, s, $2 \times \text{OCH}_3$), 3.19 (1H, m, NH), 2.65 (2H, m, CH_2NH), 2.24 (2H, m, CH_2COOH), 1.81 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.18 (3H, t, $J = 6.8$, CH_3)。

[0027] 从 $^1\text{H-NMR}$ 结果可知, 所合成的产物为目标物。

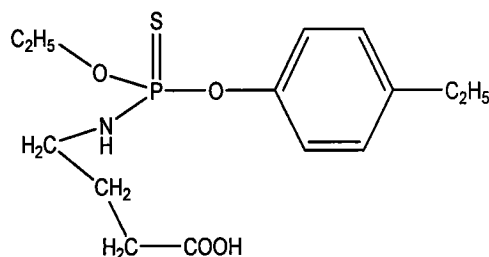
[0028] 实施例 2、竞争半抗原 H2 的合成:

[0029] 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°C 下反应 1 小时, 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。

[0030] 2) 按三乙胺 : O-乙基硫代磷酰二氯 : 对乙基苯酚 = 6.7 : 1.3 : 1 的投料比 (摩尔比), 在三口烧瓶中投入三乙胺 20g 后, 将 O-乙基硫代磷酰二氯 6.03g 溶解于 20mL 乙腈, 得溶液 I; 将对乙基苯酚 1.78g 溶解于 15mL 乙腈中, 得溶液 II; 将溶液 I 和溶液 II 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-对乙基苯酚硫代磷酰一氯。

[0031] 3) 按氢氧化钠 : 氨基丁酸 : O-乙基 -O-4-对乙基苯酚硫代磷酰一氯 = 2.5 : 1.2 : 1 (摩尔比) 的投料比, 在三口烧瓶中投入 O-乙基 -O-4-对乙基苯酚硫代磷酰一氯 3.98g 溶解于 20mL 甲醇。1.56g 氢氧化钠、1.24g 氨基丁酸与水混合后配成 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 30°C , 反应 2.5 小时。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 H2, 结构见下:

[0032]



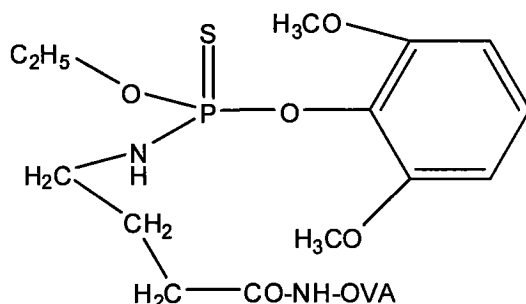
[0033] 取上述合成的产物分别经 ESI、 $^1\text{H-NMR}$ 和 IR 测定其分子结构。 $^1\text{H-NMR}$ 结果如下: δ 7.15 (4H, m, ArH), 4.20 (2H, m, CH_2OP), 4.06 (1H, m, NH), 3.15 (2H, m, CH_2NH), 2.61 (2H, m, CH_2COOH), 2.46 (2H, q, $J = 7.2$ and 7.2 , Ar- CH_2), 1.88 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.34 (3H, t, $J = 8.4$, Ar- CH_2CH_3) 1.25 (3H, t, $J = 6.8$, CH_3)。

[0034] 从 $^1\text{H-NMR}$ 结果可知, 所合成的产物为目标物。

[0035] 实施例 3、竞争原 H1-OVA 的合成:

[0036] 竞争原的合成利用混合酸酐法。将 0.25mmol 半抗原 H1 (实施例 1 所得) 溶解在 1mL 的 N,N-二甲基甲酰胺中, 加入 $60\ \mu\text{L}$ 正三丁胺和 $30\ \mu\text{L}$ 氯甲酸丁酯, 室温下反应 1 ~ 2 小时; 然后将反应液 $100\ \mu\text{L} \sim 800\ \mu\text{L}$ 加入到 5mL 10mg/mL 的卵清蛋白 (OVA) 碳酸盐缓冲溶液中, 在磁力搅拌下室温反应 2 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°C 的冰箱中。竞争原 H1-OVA 的结构式为:

[0037]

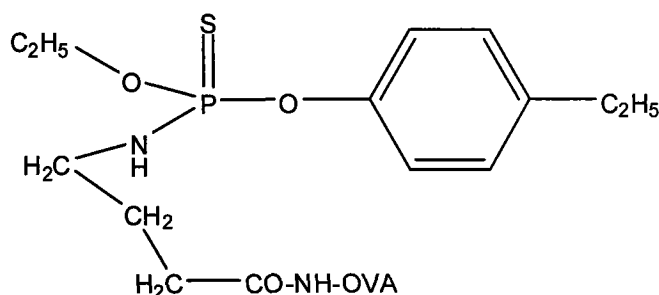


[0038] 按照合成时免疫半抗原 H1 与 OVA 反应物和产物的比例,分别取反应物和产物进行紫外 (200nm ~ 400nm) 扫描。经计算免疫半抗原与蛋白质的结合比为 5 ~ 10 : 1。

[0039] 实施例 4、竞争原 H2-OVA 的合成 :

[0040] 竞争原的合成利用混合酸酐法。将 0.25mmol 半抗原 H2 (实施例 2 所得) 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,在磁力搅拌下室温反应 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 $^{\circ}$ C 的冰箱中。竞争原 H2-OVA 的结构式为 :

[0041]



[0042] 按照合成时免疫半抗原 H2 与 OVA 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。经计算免疫半抗原与蛋白质的结合比为 3 ~ 8 : 1。

[0043] 实施例 5、乙基对硫磷异源 ELISA 建立与鉴定 :

[0044] 利用免疫原 PB-BSA 免疫兔子获得的多抗 (具体内容请详见申请号 : 200610052531.0 的发明专利《乙基对硫磷人工半抗原、人工抗原、抗体制备法及其用途》),对设计的竞争原建立针对乙基对硫磷的异源 ELISA 方法。建立的方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,同时操作方法简单快速,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。

[0045] 5.1 最佳抗体工作浓度和包被抗原复合物浓度的确定

[0046] 选择抗体和竞争原 H1-OVA 用方阵滴定法,同时稀释抗体和固相抗原包被液,ELISA 反应模式为间接竞争法。在同一竞争原包被液浓度下,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。通常选择 OD 值 1.0 左右时的抗体和包被竞争原浓度作为工作浓度。从实验可知,当抗体浓度为 4.0 μ g/mL、包被竞争原 H1-OVA 为 0.25 μ g/mL 时 OD 值约等于 1.0。

[0047] 5.2 异源 ELISA 分析方法标准曲线的建立

[0048] 5.2.1 包被

[0049] 1) 包被抗原溶液的配制

[0050] 从低温冰箱中取出 H1-OVA 偶联复合物 (实施例 3 所得), 使之完全解冻后, 稀释成相应工作浓度, 即 $0.25 \mu\text{g/mL}$ 。

[0051] 2) 微量反应板的包被

[0052] 96 孔聚苯乙烯微量反应板加入上面所配的抗原包被液 $100 \mu\text{L}$ /孔, 于 37°C 温箱中温育 2h。

[0053] 5.2.2 封闭

[0054] 取出包被好的微量反应板, 甩掉包被液, 用 PBST (含 0.05% 吐温 -20 的 0.01MPBS , $\text{pH}7.4$) 洗涤 3 次后, 每孔加入 2.0% 的脱脂奶 $300 \mu\text{L}$, 于 37°C 温箱中温育 0.5h , 用 PBST 洗涤 3 次。

[0055] 5.2.3 点板

[0056] 1) 配制乙基对硫磷的标准溶液

[0057] 取乙基对硫磷标样, 用甲醇配制成 100mg/L 的标准溶液, 从中取出 1mL , 加入 9mL $\text{PBS}(0.01\text{M}, \text{pH}7.4)$ 溶液, 使之成 10mg/L 溶液, 再用含 10% 甲醇的 PBS 溶液稀释成 $156.25, 78.13, 39.06, 19.53, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.61, 0.30, 0.15, 0.07\text{ng/mL}$ 。

[0058] 2) 乙基对硫磷抗体稀释液的配制

[0059] 从冰箱中取出已经配制成适当浓度的抗 PB-BSA 抗体, 用 PBS 稀释成工作浓度 $4.0 \mu\text{g/mL}$ 。

[0060] 3) 点板

[0061] 取出已包被的板, 每孔加入一系列浓度的乙基对硫磷标准液 $50 \mu\text{L}$, 再加入抗体稀释液 $50 \mu\text{L}$, 空白对照孔加入 $\text{PBS } 50 \mu\text{L}$ 和抗体稀释液 $50 \mu\text{L}$, 用微量振荡器混匀, 放入 37°C 温箱中温育 1h , 用 PBST 溶液洗涤 3 次。

[0062] 5.2.4 加酶标二抗

[0063] 每孔加入经 $1:1000$ 稀释的羊抗兔辣根过氧化物酶 PBS 溶液 $100 \mu\text{L}$, 放入 37°C 温箱中 1 小时, 用 PBST 溶液洗涤 3 次。

[0064] 5.2.5 显色

[0065] 每孔加入底物 OPD- 过氧化氢溶液 $100 \mu\text{L}$, 37°C 温箱中温育 15min , 用 $2\text{M H}_2\text{SO}_4(50 \mu\text{L}/\text{孔})$ 终止反应。在酶标仪上测定 490nm 波长下的吸光值。然后绘制乙基对硫磷抑制免疫反应的标准曲线图, 其中以抑制率为纵坐标、乙基对硫磷浓度的对数为横坐标, 并分别求出抑制反应 50% 和 10% 所需的浓度 IC_{50} 和 IC_{10} 抑制率按下式计算:

[0066]

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

[0067] 式中: OD_{max} 为不加药时的吸光值, OD_x 为乙基对硫磷浓度为 x 时的吸光值, OD_{min} 为空白对照孔的吸光值。

[0068] 5.3 异源 ELISA 分析方法的亲和性

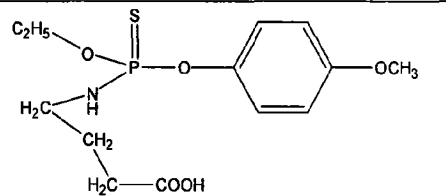
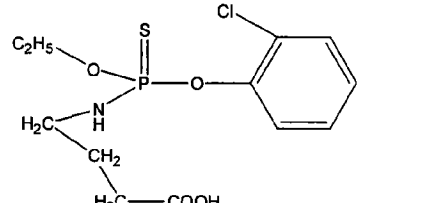
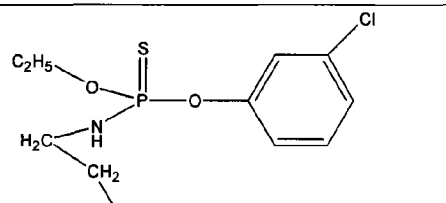
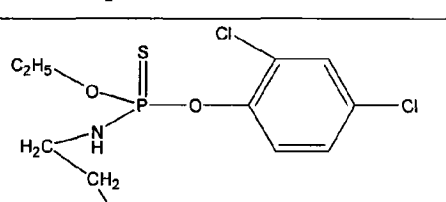
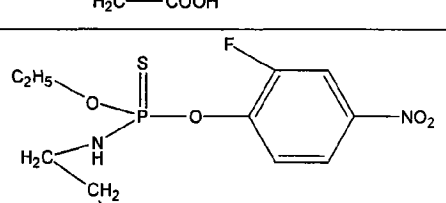
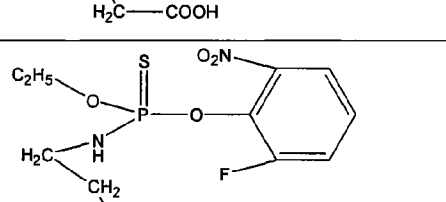
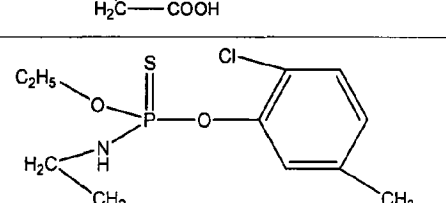
[0069] 部分竞争半抗原建立的异源 ELISA 分析方法的标线结果见表 1。

[0070] 表 1、部分竞争半抗原建立的异源 ELISA 结果

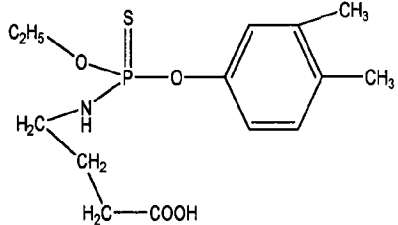
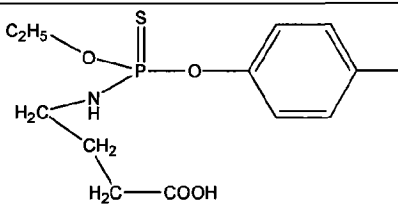
[0071]

编号	结构式	标线方程	R ²	IC ₅₀ (ng/mL)	IC ₁₀ (ng/mL)
H1		$y = 10.012\text{Ln}(x) + 32.768$	0.9767	5.60	0.10
H2		$y = 11.682\text{Ln}(x) + 16.7319$	0.9911	17.25	0.56

[0072]

H3		$y = 11.976\text{Ln}(x) + 15.8196$	0.9799	17.36	0.62
H4		$y = 12.352\text{Ln}(x) + 3.3143$	0.9987	43.80	1.72
H5		$y = 12.280\text{Ln}(x) + 2.2335$	0.9777	48.50	1.88
H6		$y = 12.003\text{Ln}(x) + 1.2647$	0.9856	57.99	2.07
H7		$y = 10.276\text{Ln}(x) + 7.1442$	0.9875	64.75	1.32
H8		$y = 11.664\text{Ln}(x) + 13.5521$	0.9962	22.76	0.74
H9		$y = 13.664\text{Ln}(x) + 4.4021$	0.9967	28.14	1.51

[0073]

H10		$y = 10.485\ln(x) + 11.7337$	0.9635	38.46	0.85
H11		$y = 12.737\ln(x) + 2.1736$	0.9775	42.73	1.85

[0074] 以免疫原 PB-BSA 和竞争原 H1-OVA 建立的异源 ELISA 分析方法的标准曲线方程是： $y = 10.012\ln(x) + 32.768$ ， IC_{50} 为 5.60ng/mL， IC_{10} 为 0.10ng/mL。而通过 PB-OVA 建立的同源 ELISA 分析方法的标准曲线方程是： $y = 10.192\ln(x) + 5.1192$ ， IC_{50} 为 81.64ng/mL， IC_{10} 为 1.61ng/mL。很明显，异源分析方法对乙基对硫磷的检测灵敏度高于同源分析，以 IC_{10} 计，异源分析比同源分析的方法灵敏度提高了 16.1 倍。

[0075] 5.4 异源 ELISA 分析方法的特异性

[0076] 对免疫原 PB-BSA 和竞争原 H1-OVA 建立的异源 ELISA 分析方法进行交叉反应率实验。选取交叉反应物为：甲基对硫磷、对氧磷、二嗪磷、氨基对硫磷、4-硝基苯酚、0,0-二乙基硫代磷酰一氯、三唑磷、倍硫磷、杀螟松、毒死蜱、甲基毒死蜱等 12 种有机磷类农药和中间体，进行了交叉反应率测定，得出各种药物的抑制中浓度 (IC_{50})，然后与该方法对乙基对硫磷的 IC_{50} 进行比较，交叉反应率越低，说明该方法的特异性越高。交叉反应率的计算为： $CR(\%) = [IC_{50}(\text{对硫磷}) / IC_{50}(\text{其它化合物})] \times 100\%$ 。10 种化合物的交叉反应率实验结果见表 2。结果表明，建立的异源竞争 ELISA 方法对其它结构类似物的 CR 基本小于 0.05%，仅甲基对硫磷为 7.8%，对氧磷为 2.5%，说明这些有机磷农药和中间体对乙基对硫磷的测定基本没有干扰，该方法对乙基对硫磷测定的特异性高。

[0077] 表 2、交叉反应率结果

[0078]

化合物	IC_{50} (ng/mL)	CR (%)
乙基对硫磷	4.79	100
甲基对硫磷	61.45	7.8
对氧磷	191.68	2.5
二嗪磷	> 10000	< 0.05
氨基对硫磷	> 10000	< 0.05
4-硝基苯酚	> 10000	< 0.05

0, 0- 二乙基硫代磷酰一 氯	> 10000	< 0.05
三唑磷	> 10000	< 0.05
倍硫磷	> 10000	< 0.05
杀螟松	684.29	0.7
毒死蜱	> 10000	< 0.05
甲基毒死蜱	> 10000	< 0.05

[0079] 5.5 异源 ELISA 分析方法检测实际样品的能力

[0080] 对免疫原 PB-BSA 和竞争原 H1-OVA 建立的异源 ELISA 分析方法, 进行水、土壤、黄瓜、大米和玉米 5 种样品中的乙基对硫磷添加回收率实验。样品前处理过程如下:

[0081] 水样: 吸取 10mL 预先过滤或离心的水样品, 准确添加以甲醇配制的农药标液 0.1mL, 混匀, 直接用于 ELISA 检测。

[0082] 土壤样品: 将土壤样品风干, 过 60 目试验筛, 取筛下样品按四分法分样后, 称取 2g 样品, 以 2mL 乙腈震荡提取 1min, 离心 (4000rpm, 5min), 吸取 1mL 上清液, 氮气吹干, 加入一定量的 PBS (含 10% 甲醇), 旋涡震荡 1min, 用于 ELISA 检测。

[0083] 黄瓜样品: 称取 10g 预先捣碎的样品, 准确添加以甲醇配制的农药标液 0.1mL, 准确加入 10mL 乙腈震荡提取 1min。加入 1g 氯化钠和 4g 硫酸镁, 振摇 1min, 离心 (4000rpm, 5min), 吸取 1mL 上清液, 氮气吹干, 加入一定量的 PBS (含 10% 甲醇), 旋涡震荡 1min, 用于 ELISA 检测。

[0084] 大米和玉米样品: 称取 5g 预先粉碎的样品, 准确添加以甲醇配制的农药标液 0.1mL, 加入 3mL 水, 搅拌成均匀湿粉状, 静置 30min, 准确加入 10mL 乙腈震荡提取 1min, 加入 1g 氯化钠和 4g 硫酸镁, 振摇 1min, 离心 (4000rpm, 5min), 吸取 1mL 上清液, 氮气吹干, 加入一定量的 PBS (含 10% 甲醇), 旋涡震荡 1min, 用于 ELISA 检测。

[0085] ELISA 检测方法同标准曲线的操作。已包被好的板加入系列已知添加浓度的样品液 50 μ L/ 孔, 再加配制好的抗体溶液 50 μ L/ 孔, 以未添加农药的样品液作对照孔, 用微量振荡器混匀, 37°C 温育 1 小时, 余下步骤同前。

[0086] 5 种样品的添加回收率结果见表 3。水样和土壤样品中, 添加档次为 1, 5, 10ng/mL 时, 样品回收率分别在 75.37% -92.37%, 82.59% -102.95% 之间; 黄瓜、大米和玉米样品中, 添加档次为 5, 10, 20ng/mL 时, 样品回收率分别为 78.19% -95.09%, 88.30% -107.76% 和 74.23% -101.91% 之间。从添加回收率 (Recovery)、标准偏差 (SE) 和变异系数 (CV) 结果来看, 建立的 ELISA 方法对这 5 种样品中 PA 的检测能力均符合农药残留检测准则的要求。

[0087] 表 3、5 种样品的添加回收率结果

[0088]

样品	添加浓度 (ng/mL)	回收率 (%)	SE	CV (%)
水	1.00	75.37	2.45	7.27
	5.00	87.61	6.41	16.35
	10.00	92.37	4.07	9.86
土壤	1.00	102.95	4.70	10.22
	5.00	82.59	3.32	8.98
	10.00	87.62	1.91	4.87
黄瓜	5.00	78.19	2.85	8.14
	10.00	85.81	3.61	9.41
	20.00	95.09	5.87	13.81
大米	5.00	107.76	4.75	9.86
	10.00	88.30	6.12	15.50
	20.00	103.73	2.55	5.49
玉米	5.00	74.23	4.94	14.88
	10.00	101.91	5.88	12.90
	20.00	97.96	4.94	11.27

[0089] 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)	一种乙基对硫磷竞争半抗原和竞争原及其用途		
公开(公告)号	CN101289463B	公开(公告)日	2012-04-25
申请号	CN200810062154.8	申请日	2008-06-03
[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	刘毅华 赵金浩 王春梅 郭逸蓉 桂文君 程敬丽 朱国念		
发明人	刘毅华 赵金浩 王春梅 郭逸蓉 桂文君 程敬丽 朱国念		
IPC分类号	C07F9/24 G01N33/53		
代理人(译)	金祺		
其他公开文献	CN101289463A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种乙基对硫磷竞争半抗原，其分子结构式为：其中 $n = 1 \sim 6$ ，R为以1个、2个或两两之间组合的形式存在于苯环上的原子或基团。本发明还同时提供了利用上述乙基对硫磷竞争半抗原所制成的乙基对硫磷竞争原。本发明还同时提供了利用上述乙基对硫磷竞争原和免疫原PB-BSA所建立的异源ELISA分析方法，能用于检测食品、农产品和环境样品中乙基对硫磷的残留量。

