



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105044325 B

(45)授权公告日 2016.09.21

(21)申请号 201510341109.6

(22)申请日 2015.06.18

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105044325 A

(43)申请公布日 2015.11.11

(73)专利权人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信
息产业基地高新四街8号

(72)发明人 冯才伟 罗晓琴 吴鹏 何方洋

冯静 杨烁 宋茹 王然

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

审查员 段晓露

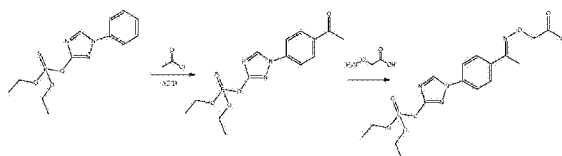
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

检测三唑磷的酶联免疫试剂盒及其应用

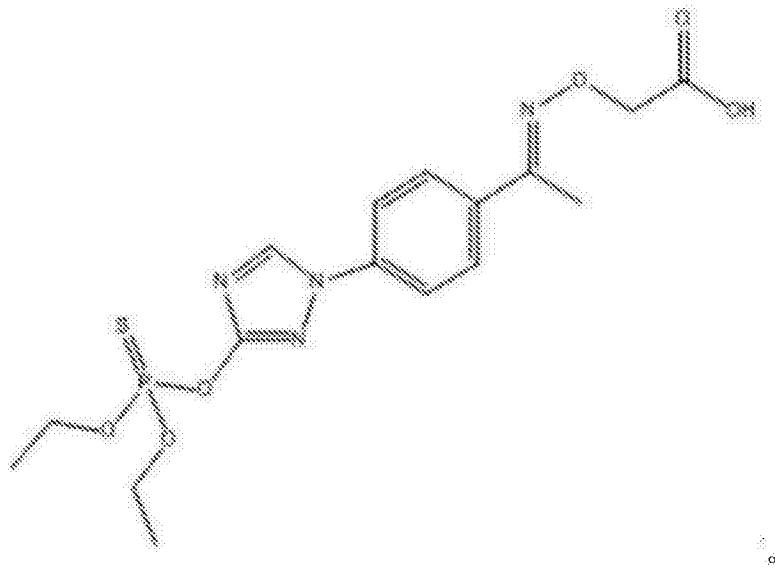
(57)摘要

本发明提供了一种检测三唑磷的酶联免疫试剂盒,它包括:包被有包被原的酶标板、三唑磷标准品溶液、酶标二抗、三唑磷特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液,所述包被原为三唑磷偶联抗原,所述酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗抗体。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测三唑磷的方法,它包括:首先进行样品前处理,然后用试剂盒进行检测,最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测蔬菜样本中三唑磷的含量,其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。



1. 一种检测三唑磷的酶联免疫试剂盒,其特征包括:包被有包被原的酶标板、三唑磷标准品溶液、酶标二抗、三唑磷特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液,所述包被原为三唑磷偶联抗原,所述酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗抗体,其特征是所述三唑磷偶联抗原是由三唑磷半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或纤维蛋白原,所述三唑磷半抗原的制备方法如下:100mL三口烧瓶中加入10mL二氯甲烷和0.5g三唑磷,降温至-5℃,搅拌下加入1.01当量的乙酰氯,控温加入2当量的三氯化铝,控温5℃反应6小时后,加稀盐酸和冰水,乙酸乙酯萃取,水洗,无水硫酸镁干燥有机相,减压蒸干溶剂,石油醚-乙酸乙酯体系重结晶得乙酰化物,100mL三口烧瓶中加入上步乙酰化物,10mL吡啶溶解,加1.2当量的羧甲基羟胺,65℃反应5小时,乙酸乙酯萃取,水洗,无水硫酸镁干燥有机相,减压蒸馏,得半抗原,两步收率58%。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征是所述三唑磷半抗原的分子结构式为:



3. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征是所述三唑磷特异性抗体是以三唑磷偶联抗原作为免疫原制备获得,所述三唑磷特异性抗体为三唑磷单克隆抗体或三唑磷多克隆抗体。

4. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征是所述三唑磷标准品溶液的浓度分别为0μg/L、1μg/L、3μg/L、9μg/L、27μg/L、81μg/L。

5. 一种检测样品中三唑磷含量的方法,包括步骤:

- (1) 样品前处理;
- (2) 用权利要求1~4任一项所述的试剂盒进行检测;
- (3) 分析检测结果。

检测三唑磷的酶联免疫试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术,具体涉及一种用于检测三唑磷的酶联免疫试剂盒,可定性、定量检测蔬菜中三唑磷药物的残留量。

背景技术

[0002] 三唑磷,又名三唑硫磷,英文通用名Triazophos,化学名称0,0-二乙基-0-(1-苯基-1,2,4-三唑-3-基)硫代磷酸酯。纯品为浅棕黄色液体,20℃时在水中的溶解度为30~40mg/L,可溶于大多数有机溶剂;对光稳定,在酸、碱介质中水解,140℃分解。三唑磷具有强烈的触杀和胃毒作用,杀虫效果好,杀卵作用明显,渗透性较强,无内吸作用,是一种中等毒、广谱有机磷杀虫剂、杀螨剂,兼有一定的杀线虫作用,已在我国水稻、棉花、蔬菜和苹果等作物上登记,主要用于防治粮食、棉花、果树、蔬菜等主要农作物上的许多重要害虫。由于三唑磷的应用效果好,相对甲胺磷等高毒农药其毒性低,因此,在农作物上应用较广泛。

[0003] 然而,三唑磷的大量使用也给一些食用农产品及环境带来了残留问题。三唑磷属有机磷农药,中等毒性,对神经、肝、肾、心、肺及生殖系统等多脏器均有明显的毒副作用,其中毒主要机理是抑制胆碱酯酶的活性。欧盟规定三唑磷最大残留限量(maximum residue limit, MRL)为不得检出的农药品种;日本“肯定列表制度”中规定,除了小麦、大麦、黑麦、玉米、荞麦、其他粮谷、棉籽和棉籽油设定了最大残留限量,其余适用“一律标准”,即0.01mg/kg;我国国家标准《GB 2763-2005食品中农药最大残留限量》中限定三唑磷的MRL为稻谷0.05mg/kg,棉籽0.1mg/kg,没有制定蔬菜中三唑磷的最大残留限量标准。因此,建立三唑磷残留的快速检测技术,加强监测、科学使用三唑磷,对于保障人类健康与食品安全,降低环境污染,减少对农副产品出口产生的影响等具有重要意义。

[0004] 我国标准体系中提供的测定蔬菜中三唑磷的方法均是多残留检测方法,有国家标准(GB/T 19648-2006、GB/T 5009.218-2008、GB/T 20769-2008、GB/T 23204-2008、GB/T 23205-2008、GB/T 23376-2009)、行业标准(NY/T 1379-2007、NY/T 761-2008、SN/T 1950-2007、SN/T 0148-2011)和地方标准(DB34/T 1076-2009),涉及到的检测方法有液相色谱法、气相色谱法和色谱-质谱联用法。仪器方法具有灵敏度高、结果准确等优点,但是资金和人员等投入成本较高。本发明应用酶联免疫法,测定蔬菜中三唑磷药物的残留量,具有检测限低、特异性强、操作简便、检测速度快、检测成本低,非常容易推广等优点。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种能够检测蔬菜中三唑磷药物残留量的酶联免疫试剂盒,并提供一种高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检测方法。

[0006] 本发明试剂盒,它包括:包被有包被原的酶标板、三唑磷标准品溶液、酶标二抗、三唑磷特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液,所述包被原为三唑磷偶联抗原,所述酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗抗体。

[0007] 所述三唑磷偶联抗原是由三唑磷半抗原与载体蛋白偶联得到,所述三唑磷半抗原

是由三唑磷和乙酰氯反应得到,所述载体蛋白可为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或纤维蛋白原。

[0008] 所述三唑磷特异性抗体是以三唑磷偶联抗原作为免疫原制备获得,所述三唑磷特异性抗体可为三唑磷单克隆抗体或三唑磷多克隆抗体,其中优选三唑磷单克隆抗体。

[0009] 所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,其中优选辣根过氧化物酶;酶标二抗是采用改良后的过碘酸钠法进行偶联得到的。

[0010] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括三唑磷标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液。

[0011] 所述三唑磷标准品溶液6瓶,浓度分别为0 μ g/L、1 μ g/L、3 μ g/L、9 μ g/L、27 μ g/L、81 μ g/L。

[0012] 当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物显色液由底物液A液和底物液B液组成,A为过氧化氢或过氧化脲,B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,所述终止液为1~2mol/L的硫酸或液盐酸缓冲液;当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时,所述底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液,所述终止液为1~2mol/L氢氧化钠溶液。

[0013] 所述洗涤液优选为pH值为7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01%~0.03%叠氮化钠防腐剂、0.1~0.3mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0014] 所述复溶液优选为pH值为7.0、0.02mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0015] 其中在酶标板制备过程中所用到的包被缓冲液为pH值为9.6,0.05mol/L的碳酸盐缓冲液,封闭液为pH值为7.1~7.5,含有1%~3%酪蛋白、0.1~0.3mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0016] 本发明中酶标板的制备过程为:用包被缓冲液将包被原稀释成20 μ g/mL,每孔加入100 μ l,25 $^{\circ}$ C避光孵育2h或4 $^{\circ}$ C过夜,倾去孔中液体,用洗涤液洗涤2次,每次30s,拍干,然后在每孔中加入150~200 μ l封闭液,25 $^{\circ}$ C避光孵育1~2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0017] 本发明的检测原理为:

[0018] 本试剂盒采用间接竞争ELISA方法,在酶标板微孔条上预包被偶联抗原,样本中残留的三唑磷与微孔条上预包被的偶联抗原竞争抗三唑磷的抗体,加入酶标二抗后,用TMB底物显色,样本吸光值与其所含三唑磷的含量成负相关,与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数,即可得出样品中三唑磷的残留量。

[0019] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测三唑磷的方法,它包括步骤:

[0020] (1)样品前处理;

[0021] (2)用试剂盒进行检测;

[0022] (3)分析检测结果。

[0023] 本发明检测三唑磷的酶联免疫试剂盒主要采用ELISA方法定性或定量检测样品中三唑磷的含量;对样品的前处理要求低,样品前处理过程简单,能同时快速检测大批量样品;主要试剂以工作液的形式提供,检验方法方便易行,具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。本发明的酶联免疫试剂盒,结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利、检测方法高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量。

附图说明

[0024] 图1:三唑磷半抗原合成路线图

[0025] 图2:三唑磷半抗原核磁共振氢谱图

[0026] 图3:试剂盒标准曲线图

具体实施方式

[0027] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0028] 实施例1 试剂盒组分的制备

[0029] 1、三唑磷半抗原的制备

[0030] 100mL三口烧瓶中加入10mL二氯甲烷和0.5g三唑磷,降温至-5℃,搅拌下加入1.01当量的乙酰氯,控温加入2当量的三氯化铝,控温5℃反应6小时后,加稀盐酸和冰水,乙酸乙酯萃取,水洗,无水硫酸镁干燥有机相,减压蒸干溶剂,石油醚-乙酸乙酯体系重结晶得乙酰化物。

[0031] 100mL三口烧瓶中加入上步乙酰化物,10mL吡啶溶解,加1.2当量的羧甲基羟胺,65℃反应5小时,乙酸乙酯萃取,水洗,无水硫酸镁干燥有机相,减压蒸馏,得半抗原,两步收率58%。

[0032] 取上述产物经核磁共振氢谱测定,如图2所示,11.0ppm的羧基信号峰、2.85ppm甲基信号峰的出现,说明半抗原合成成功。

[0033] 2、抗原的制备

[0034] 免疫原制备——三唑磷半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

[0035] 取8.5mg半抗原,溶解于1mL DMF中,取30mg EDC和NHS用0.2mL水充分溶解后,加入(1)中,室温下搅拌24h,即可得到反应液(1)。称取BSA50mg,使之充分溶解在3.8mL PB(PH 9.0)中,将反应液(1)逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌24h。用0.01mol/L PBS 4℃透析3d每天换3次透析液,以除去未反应的小分子物质。分装,于-20℃保存备用。

[0036] 包被原制备——三唑磷半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到免疫原。

[0037] 取8.5mg半抗原,溶解于1mL DMF中,取30mg EDC和NHS用0.2mL水充分溶解后,加入(1)中,室温下搅拌24h,即可得到反应液(1)。称取OVA 50mg,使之充分溶解在3.8mL PB(PH 9.0)中,将反应液(1)逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌24h。用0.01mol/L PBS 4℃透析3d每天换3次透析液,以除去未反应的小分子物质。分装,于-20℃保存备用。

[0038] 3、三唑磷单克隆抗体的制备

[0039] 动物免疫:将上述步骤得到的免疫原注入到Ba1b/c小鼠体内,免疫剂量为150μg/只,使其产生抗血清。

[0040] 细胞融合和克隆化:小鼠血清测定结果较高后,取其脾细胞,按8:1(数量配比)比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争ELISA测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到分泌三唑磷单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0041] 细胞冻存和复苏:将单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^6 个/mL的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移

入培养瓶内培养。

[0042] 单克隆抗体的生产与纯化:将Ba1b/c小鼠腹腔注入灭菌石蜡油0.5mL/只,7天后腹腔注射稳定的单克隆杂交瘤细胞株 5×10^5 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,-20℃保存。

[0043] 4、酶标二体的制备

[0044] 将羊抗鼠抗体与辣根过氧化物酶(HRP)采用改良后的过碘酸钠法进行偶联。

[0045] 5、酶标板的制备

[0046] 用包被缓冲液将包被原稀释成20μg/mL,每孔加入100μl,25℃避光孵育2h,倾去孔中液体,用洗涤液洗涤2次,每次30s,拍干,然后在每孔中加入200μl封闭液,25℃避光孵育2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0047] 实施例2 检测三唑磷的酶联免疫试剂盒的组建

[0048] 组建检测三唑磷的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

[0049] (1)包被三唑磷偶联抗原的酶标板;

[0050] (2)三唑磷标准品溶液6瓶,浓度分别为0μg/L、1μg/L、3μg/L、9μg/L、27μg/L、81μg/L;

[0051] (3)用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体;

[0052] (4)三唑磷特异性抗体;

[0053] (5)底物显色液由A液和B液组成,A液为过氧化脲,B液为四甲基联苯胺;

[0054] (6)终止液为2mol/L硫酸;

[0055] (7)洗涤液为pH值为7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01%~0.03%叠氮化钠防腐剂、0.1~0.3mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;

[0056] (8)复溶液为pH值为7.0、0.02mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0057] 实施例3 蔬菜中三唑磷的检测

[0058] 1、样品前处理

[0059] 用均质器均质组织样本;称取 2.0 ± 0.05 g均质物至10ml聚苯乙烯离心管中,分别加入2ml 0.1M氢氧化钠溶液,10ml乙酸乙酯,用振荡器振荡5min,充分混合;3000g以上,室温(20-25℃/68-77°F)离心5min;移取1ml上层有机相至10ml洁净干燥玻璃试管中;于50-60℃(122-140°F)水浴流下氮气吹干;加入1ml复溶工作液,涡动1min。取200μl加入到1800μl复溶工作液中,充分混合;取50μl用于分析。

[0060] 2、用试剂盒检测

[0061] 加标准品/样本50μl到对应的微孔中,再加入抗体工作液50μl/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30min。小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液250μl/孔,充分洗涤4-5次,每次间隔10s,用吸水纸拍干。加入酶标二抗100μl/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30min。小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液250μl/孔,充分洗涤4-5次,每次间隔10s,用吸水纸拍干。加入底物液A液50μl/孔,再加入底物液B液50μl/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃(77°F)避光环境中反应15min。加入终止液50μl/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450nm处,测定每孔OD值。

[0062] 3、检测结果分析

[0063] 标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准品(0标准)的吸光度值的平均值,再乘以100%,得到标准品或样本的百分吸光度值。以标准品百分吸光率为纵坐标,以三唑磷标准品浓度($\mu\text{g}/\text{L}$)的对数为横坐标,绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中三唑磷的实际浓度。

[0064] 实施例4 三唑磷技术参数的确定试验

[0065] 1、试剂盒灵敏度和检测限

[0066] 按照常规方法测定试剂盒灵敏度,标准曲线的范围为 $1\sim 81\mu\text{g}/\text{L}$, $1C_{50}$ (50%抑制浓度)浮动范围为 $4\sim 6\mu\text{g}/\text{L}$;对20份样品进行检测,从标准曲线上查出对应于各百分吸光度值的浓度,以20份样本浓度的平均值加上3倍标准差表示检测限,结果显示,该方法对蔬菜的检测限均为 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0067] 2、样本精密度和准确度试验

[0068] 以回收率作为准确度评价指标,重复测定某一浓度样品的检测结果相对标准偏差(RSD%)作为精密度评价指标。计算公式为:回收率(%)=实际测定值/理论值 $\times 100\%$,其中理论值为样品的添加浓度;相对标准偏差 $RSD\% = SD/X \times 100\%$,其中SD为标准偏差,X为测定数据的平均值。

[0069] 按 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 两个浓度的三唑磷分别对白菜样品进行添加回收测定,每个样品做4个平行,用三批不同试剂进行测定,计算样品的平均回收率及精密度结果见下表。

[0070] 表1 白菜样本精密度及准确度试验

[0071]

三唑磷	添加浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率(n=4)%	批内RSD(n=4)%	批间RSD(n=3)%
白菜	100	81.9	9.2	9.5
	200	75.4	9.6	9.7

[0072] 以 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 两个浓度的三唑磷分别对白菜进行添加,平均回收率在75.4%~81.9%之间;批内、批间相对标准偏差均小于10%。

[0073] 3、试剂盒稳定性试验

[0074] 试剂盒保存条件为 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$,经过12个月的测定,试剂盒的最大吸光度值(零标准)、50%抑制浓度、三唑磷添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在 37°C 保存条件下放置7天,进行加速老化实验,结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒放入 -20°C 冰箱冷冻7天,测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 至少保存12个月以上。

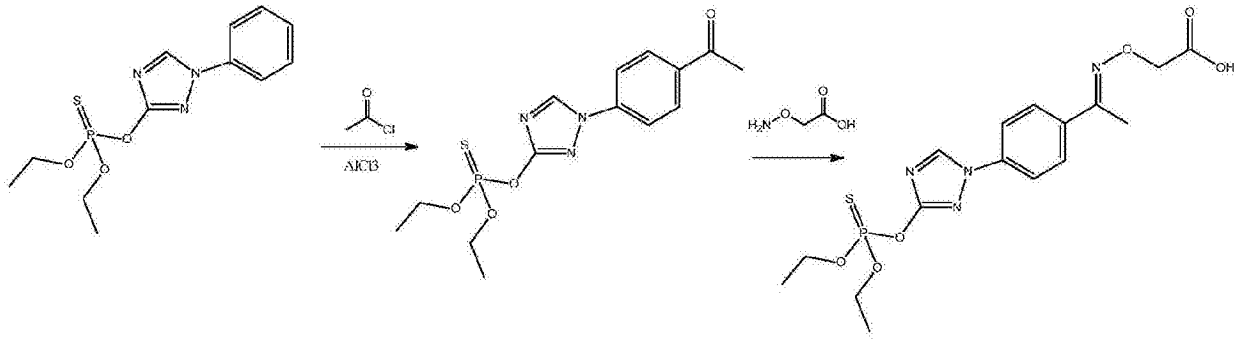


图1

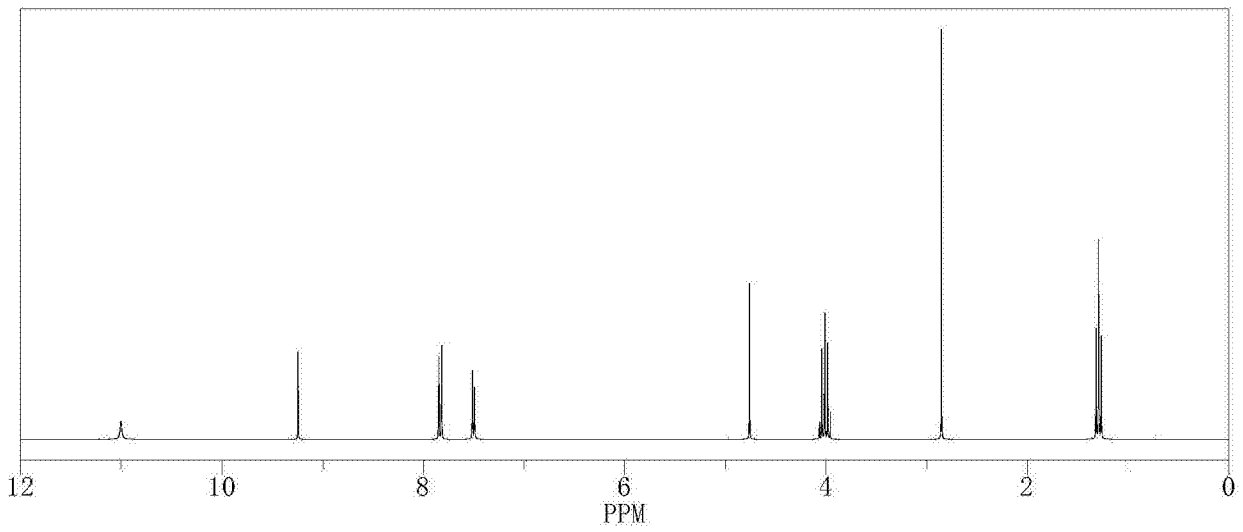


图2

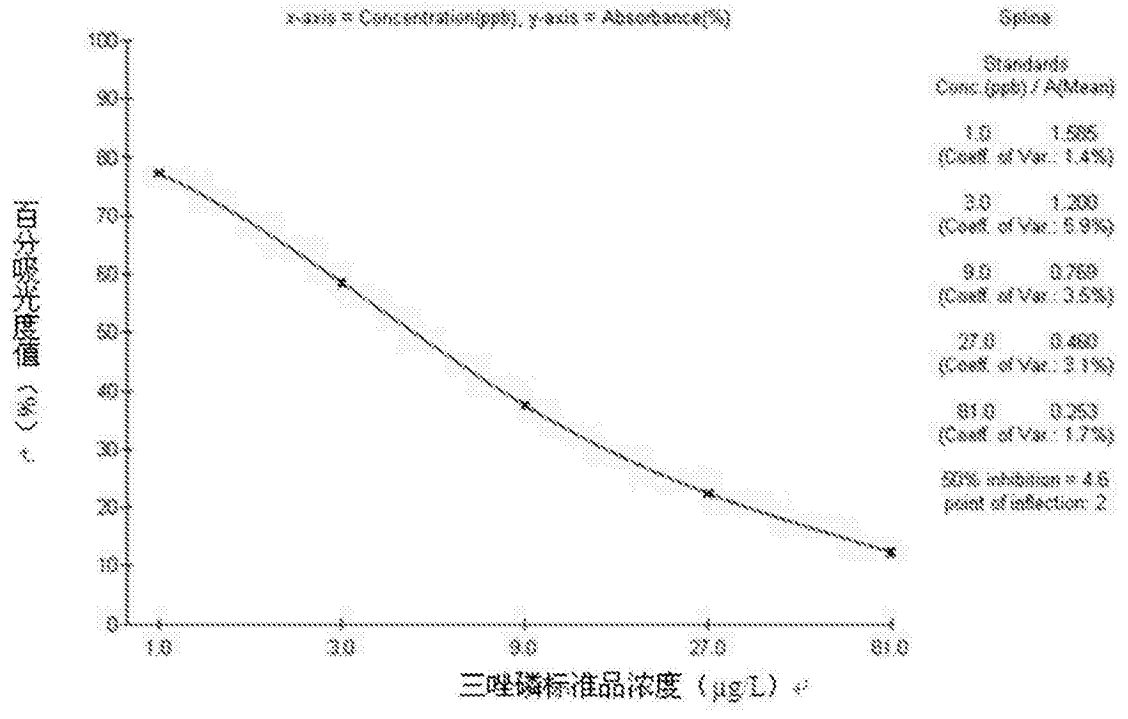


图3

专利名称(译)	检测三唑磷的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN105044325B	公开(公告)日	2016-09-21
申请号	CN201510341109.6	申请日	2015-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	冯才伟 罗晓琴 吴鹏 何方洋 冯静 杨烁 宋茹 王然		
发明人	冯才伟 罗晓琴 吴鹏 何方洋 冯静 杨烁 宋茹 王然		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
审查员(译)	段晓露		
其他公开文献	CN105044325A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测三唑磷的酶联免疫试剂盒，它包括：包被有包被原的酶标板、三唑磷标准品溶液、酶标二抗、三唑磷特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液，所述包被原为三唑磷偶联抗原，所述酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗抗体。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测三唑磷的方法，它包括：首先进行样品前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测蔬菜样本中三唑磷的含量，其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。

