

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/543

G01N 33/535



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410066163.6

[43] 公开日 2005 年 6 月 1 日

[11] 公开号 CN 1621839A

[22] 申请日 2004. 12. 10

[21] 申请号 200410066163.6

[71] 申请人 南京大学

地址 210024 江苏省南京市汉口路 22 号

[72] 发明人 孙成 刘廷凤 塔娜

邹惠仙 赵晓联 张莲芬 杨敏娜

刘亚子 周芳 钟明

[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所

代理人 汪旭东

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 1 页

[54] 发明名称 氯菊酯多克隆抗体酶联免疫检测方法

[57] 摘要

本发明公开了一种氯菊酯多克隆抗体酶联免疫检测方法，利用合成的氯菊酯免疫抗原免疫健康白兔得到多克隆抗体，筛选后以氯菊酯为标准品，以氯菊酯半抗原与 OVA 的偶联物作为包被抗原，建立土壤和食品中氯菊酯农药的间接竞争酶联免疫法。本发明建立了土壤和食品中氯菊酯农药的间接 ELISA 法，为氯菊酯在土壤和食品中的残留检测提供了快速高效的检测手段，由于采用的是多克隆抗体，费用较低并且稳定性和重复性较好。灵敏度为 0.1ppb，线性范围为 10 ~ 800ppb。免疫反应的高特异性和高亲和性使 ELISA 具有极高的选择性和灵敏性，样本前处理过程简单。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种氯菊酯多克隆抗体酶联免疫检测方法, 其特征在于利用合成的氯菊酯免疫抗原免疫健康白兔得到多克隆抗体, 筛选后以氯菊酯为标准品, 以氯菊酯半抗原与 OVA 的偶联物作为包被抗原, 建立土壤和食品中氯菊酯农药的间接竞争酶联免疫法。
2. 根据权利要求 1 所述的氯菊酯多克隆抗体酶联免疫检测方法, 其特征在于具体步骤如下:
 - (1) 以碳酸盐缓冲液稀释 OVA - Py1: 1000 ~ 1: 3000, 加入酶标板中, 每孔 100 μ L。4 $^{\circ}$ C 孵育过夜或 37 $^{\circ}$ C 2 ~ 4h。按照常规 ELISA 法封闭洗涤;
 - (2) 将抗血清稀释 1000 ~ 4000 倍后, 每孔 50 μ L 加入酶标板中, 同时加入一系列浓度的氯菊酯标准品, 每孔 50 μ L。温育 1h 后以 PBST 洗涤 3 ~ 5 次;
 - (3) 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 (GAR - HRP), 以 0.1% BSA/PBS 稀释为 1: 1000 ~ 1: 3000。每孔 100 μ L。37 $^{\circ}$ C 作用 1h 后以 PBST 洗涤 3 ~ 5 次;
 - (4) 配制底物溶液:
 - A: 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB) 溶解于无水乙醇中, 再定容至 1000mL;
 - B: 磷酸氢二钠, 柠檬酸及 0.5 $^{-}$ 0.75% H₂O₂ 溶解于 1000mL 蒸馏水中。使用前把 A、B 等体积混合;
 - (5) 加入底物混合液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 显色 15min; 加入终止液 2M H₂SO₄, 酶标仪 450nm 测吸光度 (OD) 值。
3. 根据权利要求 2 所述的氯菊酯多克隆抗体酶联免疫检测方法, 其特征在于土壤的提取方法为氯菊酯溶于乙醚或丙酮或甲醇或二氯甲烷等有机溶剂, 再分别加至一定量的阴性土样中, 使氯菊酯在土样中的终浓度为 1.25ng/g, 100ng/g, 1250ng/g 暗处自然挥发; 再分别加入 1:1 ~ 1:5 丙酮/正己烷混合溶剂, 超声萃取, 过滤, 滤液氮气吹干, 再以 10 ~ 70% 的甲醇/PBS 溶解后 ELISA 检测; 由于氯菊酯的高度疏水性及非极性, 极易吸附于玻璃器皿壁上, 溶解时要充分振荡。
4. 根据权利要求 2 所述的氯菊酯多克隆抗体酶联免疫检测方法, 其特征在于抗原抗体反应的 pH 值必须在中性或弱酸性条件下进行。

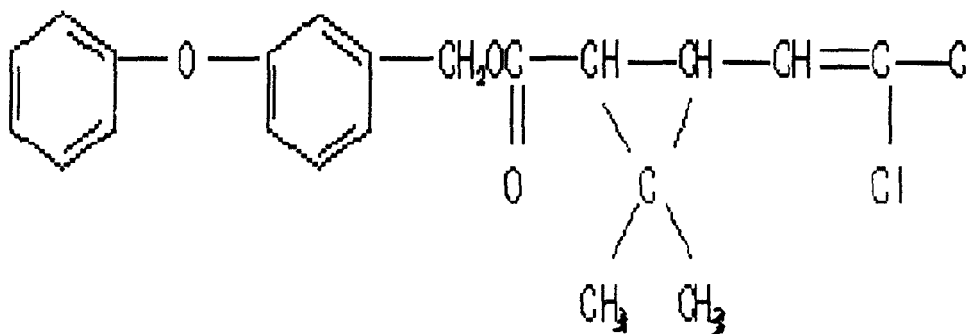
氯菊酯多克隆抗体酶联免疫检测方法

一、技术领域

本发明涉及一种农药残留检测方法，更具体地说是用酶联免疫吸附方法（ELISA）检测土壤和食品中氯菊酯的残留。

二、背景技术

随着一度占主导地位的有机磷农药从市场的逐渐退出，菊酯类农药应用越来越广泛。其中氯菊酯占 53% 以上。一般认为拟除虫菊酯类农药对哺乳类动物是安全的，但是氯菊酯对无位点的无脊椎动物及鱼类有较强的毒性并在某些水生动物中具有较高的生物富集浓度。人们食用了被污染的水以及水生食品，具有潜在的危险。据报道人体接触氯菊酯后会出现免疫系统毒性和抑制性可逆症状，一些菊酯类农药还会造成淋巴节以及脾脏损害甚至致癌。由于菊酯类农药使用得当具有农业生态学上的显著优点，但又对环境存在潜在的危险。所以需要一种灵敏、快速、选择性的残留检测方法。



氯菊酯 (Permethrin)

目前对氯菊酯残留的检测方法较多，有高效液相色谱法（HPLC）、气相色谱—电子捕获法（GC—ECD）以及气相色谱—质谱（GC—MS）。尽管这些方法灵敏度较高，但样品的前处理步骤较多，相对费时且检测费用较高，特别是不适用于大量样品的筛选。

酶联免疫吸附测定法（ELISA）提供了一种痕量氯菊酯的快速、灵敏、选择

性检测方法。科学家们先后建立了几种测定氯菊酯的 ELISA 检测方法。1989 年, Stanker, L.H., 等在 Journal of Agriculture Food Chemistry 发表《An immunoassay for Pyrethroids: detection of permethrin in meat》(Vol.37, 834-839) 中以含有苯氧基苄基和环丙烷环的免疫原, 免疫得到单克隆抗体。建立了肉类中氯菊酯的残留 ELISA 分析法。1992 年, John H. 等人在 Journal of Agriculture Food Chemistry 发表《Analysis of the synthetic pyrethroids, permethrin and 1(R)-phenothrin, in grain using a monoclonal antibody-based test》(Vol.40, 1287-1292) 中以单克隆抗体建立了对合成菊酯, 氯菊酯和 1-(R) 苯醚菊酯在谷物和面粉中的残留 ELISA 检测法。 I_{50} 为 $10 \mu\text{g/L}$ 。2000 年, Guomin Shan 等在 Journal of Agriculture Food Chemistry 发表《Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Pyrethroid Permethrin》(Vol.48, 4032-4040) 中利用不同构型的氯菊酯半抗原同甲状腺球蛋白偶联免疫得到单克隆抗体, 建立了一种高灵敏度的氯菊酯 ELISA 法并用 GC-MS 证实。 I_{50} 为 $2.5 \mu\text{g/L}$ 。2001 年, Takaho Watqanabe 等在 Analytica Chimica Acta 上发表文章《Development of a class-specific immunoassay for the type I pyrethroid insecticides》(第 444 卷 119-129) 中利用氯菊酯半抗原 2, 2-二甲基-3-(5'-羰基-五-1' 烯基环丙烷羧酸-(3-苯氧基苄基酯) 与 OVA(卵白蛋白) 偶联后免疫获得的多克隆抗体建立了对 I 类菊酯的特异性 ELISA 检测法。主要用于区分 I 类和 II 类菊酯。 I_{50} 为 $30 \mu\text{g/L}$ 。目前国内还没有人建立氯菊酯的 ELISA 残留检测法。

这些方法均能很好地检测出食品及植物中的氯菊酯残留量, 为食品安全以及环境保护提供了检测工具和手段。但是上述方法要求环境样品必须经过提纯或浓缩, 否则不具有痕量分析的灵敏度。而且大多使用单克隆抗体, 单克隆抗体制备过程复杂, 价格昂贵, 不宜普及。目前还缺少切实可行的土壤基体中氯菊酯残留的检测方法。

三、发明内容

1、发明目的

本发明的目的在于提供一种快速检测土壤和食品中氯菊酯农药残留的酶免

疫学方法,使样品无须经过繁琐的提纯或浓缩步骤,并且保证较高的敏感性及特异性。

2、技术方案

本发明的技术方案如下:利用张进琪、邹惠仙(酶联拟除虫菊酯前体物的合成[J]有机化学,2003(23)专刊:163)等合成的氯菊酯免疫抗原免疫健康白兔得到多克隆抗体,筛选后以氯菊酯为标准品,以氯菊酯半抗原与OVA的偶联物作为包被抗原,建立土壤和食品中氯菊酯农药的间接竞争酶联免疫法。

本发明通过以下步骤实现:

(1)以碳酸盐缓冲液稀释OVA-Py1:1000~1:3000,加入酶标板中,每孔100 μ L。4 $^{\circ}$ C孵育过夜或37 $^{\circ}$ C2~4h。按照常规ELISA法封闭洗涤;

(2)将抗血清稀释1000~4000倍后,每孔50 μ L加入酶标板中,同时加入一系列浓度的氯菊酯标准品,每孔50 μ L。温育1h后以PBST洗涤3~5次;

(3)加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔(GAR-HRP),以0.1%BSA/PBS稀释为1:1000~1:3000。每孔100 μ L。37 $^{\circ}$ C作用1h后以PBST洗涤3~5次;

(4)配制底物溶液:

A:3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)溶解于无水乙醇中,再定容至1000mL;

B:磷酸氢二钠,柠檬酸及0.5~0.75% H_2O_2 溶解于1000mL蒸馏水中。使用前把A、B等体积混合;

(5)加入底物混合液100 μ L,37 $^{\circ}$ C显色15min;加入终止液2M H_2SO_4 ,酶标仪450nm测吸光度(OD)值。

更详细的步骤为:

- 1)配制磷酸盐(PBS)缓冲液:磷酸氢二钠2.9g,磷酸二氢钠0.296g,氯化钠8.5g,加蒸馏水稀释至1000mL,pH7.4。
- 2)配制碳酸盐(CBS)缓冲液:碳酸钠0.315g,碳酸氢钠0.588g,加蒸馏水稀释至100mL,pH9.6。
- 3)合成OVA-Py(氯菊酯半抗原Py与卵白蛋白OVA偶联物)
- 4)以碳酸盐缓冲液稀释OVA-Py1:1000~3000,加入酶标板中,每孔100 μ L。4 $^{\circ}$ C孵育过夜或37 $^{\circ}$ C2~4h。
- 5)配制BSA/PBS封闭液:称取1gBSA溶解于200mLPBS配制成0.5%的BSA/PBS

封闭液。

- 6) 甩去包被抗原液后, 以 PBST 洗涤 2 遍, 加入 BSA/PBS 封闭液, 每孔 200 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 2h。
- 7) 取 PBS 液 500mL, 加入 50 μ L 的吐温-20 (Tween-20), 配成 1/1000 Tween-20/PBS 的洗涤液 (PBST)。
- 8) 甩去酶标板中的封闭液, 用 PBST 洗涤两遍, 每次 2~3 分钟。
- 9) 将抗血清稀释 1000~4000 倍后, 每孔 50 μ L 加入酶标板中, 同时加入一系列浓度的氯菊酯标准品, 每孔 50 μ L。温育 1h 后以 PBST 洗涤 3~5 次。
- 10) 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 (GAR-HRP), 以 0.1%BSA/PBS 稀释为 1:1000~1:3000。每孔 100 μ L。37 $^{\circ}$ C 作用 1h 后以 PBST 洗涤 3~5 次。
- 11) 配制底物溶液: A: 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 200mg 溶解于无水乙醇 100mL 中, 再加蒸馏水稀释至 1000mL。B: 磷酸氢二钠 14.6g, 柠檬酸 9.33g, 0.75% H_2O_2 溶解于 1000mL 蒸馏水中。使用前 A、B 等体积混合。
- 12) 加入底物混合液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 显色 15min。
- 13) 加入终止液 2M H_2SO_4 , 酶标仪 450nm 测吸光度 (OD) 值。

土壤的提取方法为氯菊酯溶于乙醚或丙酮或甲醇或二氯甲烷等有机溶剂, 再分别加至一定量的阴性土样中, 使氯菊酯在土样中的终浓度为 1.25ng/g, 100ng/g, 1250ng/g 暗处自然挥发; 再分别加入 1:1~1:5 丙酮/正己烷混合溶剂, 超声萃取, 过滤, 滤液氮气吹干, 再以 10~70% 的甲醇/PBS 溶解后 ELISA 检测; 由于氯菊酯的高度疏水性及非极性, 极易吸附于玻璃器皿壁上, 溶解时要充分振荡。

3、有益效果

本发明建立了土壤和食品中氯菊酯农药的间接 ELISA 法, 为氯菊酯在土壤和食品中的残留检测提供了快速高效的检测手段, 由于采用的是多克隆抗体, 费用较低并且稳定性和重复性较好。灵敏度为 0.1ppb, 线性范围为 10~800ppb。I₅₀ 为 232.2 μ g/L, 回收率为 71.4%。与其它菊酯类农药几乎无交叉反应。免疫反应的高特异性和高亲和性使 ELISA 具有极高的选择性和灵敏性, 样本前处理过程简单。

四、说明书附图

图1为抗原检测标准曲线

五、具体实施方式

以下通过实施例进一步说明本发明

一、仪器：

酶标仪（MK3, Labsystem, 芬兰）

双波长紫外可见分光光度仪（Shimadzu, UV-190, 日本）

冷冻干燥机（Labconco, 4.5L, 美国）

高速冷冻离心机（HITACHI, 日本）

磁力搅拌器（Werke, IKA, 德国）

漩涡混匀器（MS2, IKA, 德国）

微型摇床（KSI30, IKA, 德国）

二、试剂：

辣根过氧化物酶（上海雪满生物科技有限公司，BR）

1-乙基-3, (3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐（EDC.HCl）（上海丽珠东风生物制剂有限公司，BR）

N-羟基丁二酰亚胺（中国医药集团上海化学试剂公司，BR）

1,4-二氧六环（上海凌峰化学试剂有限公司，CR）

DMF（上海试剂一厂，CR）

酶标记羊抗兔GAR-HRP（华美生物工程公司，BR）

BSA（上海实生细胞生物技术有限公司，BR）

OVA（上海实生细胞生物技术有限公司，BR）

卡介苗冻干制剂

三、佐剂：

费氏不完全佐剂：取10mL液体石蜡至研钵中，加入6mL羊毛脂，研磨混匀，2mL分装，高压灭菌后20℃存放。

费氏完全佐剂：在不完全佐剂中加入3mg/mL卡介苗，混匀。

四、步骤

1. 免疫原和包被原的合成

1) 合成 BSA-Py (氯菊酯半抗原 Py 与牛血清白蛋白 BSA 偶联物)

用 EDC 法偶联, 具体步骤如下:

- (1)取 10mg 半抗原溶于 1ml 1,4 二氧六环中, 加入 6mg EDC.HCL。
- (2)滴加 50mg BSA 溶于 3ml pH 7.4 (0.01M) 的 PBS 溶液。
- (3)搅拌反应 30min, 再加入 6mg EDC.HCL, 4℃ 搅拌反应 24h, 过滤。
- (4)反应完成后装入透析袋, PBS 透析 72h。分装冻干保存于 -20℃ 冰箱中。

2) 合成 OVA-Py (氯菊酯半抗原 Py 与卵白蛋白 OVA 偶联物)

用活泼酯法偶联, 具体步骤如下:

- (1)取 10mg 半抗原溶于 2ml DMF 中, 加入 6mg EDC.HCL 和 6mg N-羟基丁二酰亚胺, 室温搅拌反应过夜。
- (2)50mg OVA 溶于 8ml pH 7.4 (0.01M) 的 PBS 溶液, 向溶液中缓慢地滴加上述得到的活泼酯。
- (3)搅拌反应 30min 后再加入 6mg EDC.HCL, 4℃ 搅拌反应 24h, 过滤。
- (4)装入透析袋, PBS 透析 72h。UV 检测 (252.5nm, 405nm)。

2. 抗血清的制备

- (1)实验动物: 新西兰大白兔 2 只, 体重在 1.75kg 左右。
- (2)抗原配制: 用 1.08ml 生理盐水将 10.8mg Py-BSA 偶联物溶解, 配制成 10mg/mL 的抗原, -20℃ 保存。
- (3)免疫方法: 第 1 周给家兔肌肉注射卡介苗 0.2mL/只 (约 15mg), 采耳血, 备用。首次免疫用完全佐剂 0.5mL + 抗原 Py-BSA 100 μ L, 充分混匀, 背部皮内多点注射。2 周后进行加强免疫, 不完全佐剂 0.5mL + 抗原 Py-BSA 50 μ L, 充分混匀, 背部皮内多点注射。4 周后进行二次加强免疫, 不完全佐剂 0.5mL + 抗原 Py-BSA 50 μ L, 充分混匀, 背部皮内多点注射。每次免疫间隔 4 周。
- (4)采血: 首次免疫后第 5 周, 第 7 周, 第 11 周采耳血 1 次, 血清鉴定, 并于第 11 周静脉取血, 分离血清。
- (5)抗体的纯化和保存: 饱和硫酸铵沉淀法纯化, 用 50% 和 33% 饱和硫酸铵沉淀, 依次进行 3 次。纯化后的抗体用 0.01mol/L PBS (pH 7.4) 4℃ 冰箱中透析, 浓缩, 分装小瓶, 冷冻干燥, 放 -20℃ 冰箱保存备用。

3. 配制磷酸盐 (PBS) 缓冲液: 磷酸氢二钠 2.9g, 磷酸二氢钠 0.296g, 氯化钠 8.5g, 加蒸馏水稀释至 1000mL, pH7.4。
4. 配制碳酸盐 (CBS) 缓冲液: 碳酸钠 0.315g, 碳酸氢钠 0.588g, 加蒸馏水稀释至 100mL, pH9.6。
5. ELISA 反应过程:
 - 1) 以碳酸盐缓冲液稀释 OVA-Py 1:2500, 加入酶标板中, 每孔 100 μ L。4 $^{\circ}$ C 孵育过夜或 37 $^{\circ}$ C 2~4h。
 - 2) 配制 BSA/PBS 封闭液: 称取 BSA 1g 溶液 100mL PBS 缓冲液中得到 1% 的 BSA/PBS 封闭液。
 - 3) 甩去包被抗原液后, 以 PBST 洗涤 2 遍, 加入 BSA/PBS 封闭液, 每孔 200 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 2h。
 - 4) 取 PBS 液 500mL, 加入 50 μ L 的吐温-20 (Tween-20), 配成 1/1000 Tween-20/PBS 的洗涤液 (PBST)。
 - 5) 甩去酶标板中的封闭液, 用 PBST 洗涤两遍, 每次 2~3 分钟。
 - 6) 将抗血清稀释 2500 倍后, 每孔 50 μ L 加入酶标板中, 同时加入一系列浓度的氯菊酯标准品, 每孔 50 μ L。温育 1h 后以 PBST 洗涤 3~5 次。
 - 7) 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 (GAR-HRP), 以 0.1% BSA/PBS 稀释为 1:3000 或 1:1000。每孔 100 μ L。37 $^{\circ}$ C 作用 1h 后以 PBST 洗涤 3~5 次。
 - 8) 配制底物溶液:
 - A: 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 200mg 溶解于无水乙醇 100mL 中, 再加蒸馏水稀释至 1000mL。
 - B: 磷酸氢二钠 14.6g, 柠檬酸 9.33g, 0.75% H_2O_2 溶解于 1000mL 蒸馏水中。使用前把 A、B 等体积混合。
 - 9) 加入底物混合液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 显色 15min。
 - 10) 加入终止液 2M H_2SO_4 , 酶标仪 450nm 测吸光度 (OD) 值。

6 回收率测定及土壤样品提取方法确定

氯菊酯溶于乙醚乙醚或丙酮或甲醇或二氯甲烷等有机溶剂, 再分别加至一定量的阴性土样中, 使氯菊酯在土样中的终浓度为 1.25ng/g, 100ng/g, 1250ng/g。暗处自然挥发。再分别加入 1:1~1:5 丙酮/正己烷混合溶剂, 超声萃取 20min~

4h, 过滤, 滤液氮气吹干, 再以 10~40% 的甲醇/PBS 溶解后 ELISA 检测。由于氯菊酯的高度疏水性及非极性, 极易吸附于玻璃器皿壁上, 溶解时要充分振荡。
 氯菊酯含量 = ELISA 检测浓度 × 样品提取液体积 / 样品重量。

实验结果如下

1. 标准曲线

本试验所获得的抗原检测线性范围为 10~800 μg/L。超过 800 μg/L 即为水平线。I₅₀ 为 232.2 μg/L。具体请见说明书附图 1。

2: 灵敏度

灵敏度是与阴性孔吸光度值差值等于 0.2 的标准品浓度。确定方法为
 $[(A_{\text{阴性}} - A_x) / A_{\text{阴性}}] \times 100\% = 20\%$, 本发明灵敏度为 0.1 μg/L。

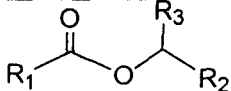
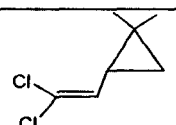
表 1 灵敏度测试结果

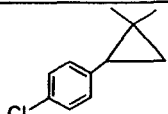
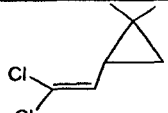

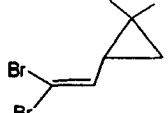
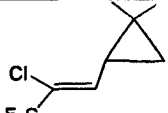
	1	2	3	4	标准品 (μg/L)
A	1.228	1.252	1.236	1.326	0
B	1.184	1.044	1.188	1.179	0.01
C	0.950	0.993	0.998	0.982	0.1
D	0.862	0.910	0.873	1.051	1

3: 交叉反应率 (Cross Reactive, C. R%)

利用氯菊酯标准品和类似结构的相关化合物进行交叉反应研究。CR = 氯菊酯 I₅₀ / 其它农药 I₅₀ (I₅₀ 是抑制率为 50% 的吸光度时的氯菊酯标准品浓度)。从下表数据可知其它类似结构农药交叉反应率很低, 说明本系统抗体具有较好的特异性。

表 2 交叉反应率测定结果

构型					C. R%
农药	R ₁	R ₂	R ₃		
氯菊酯 permethrin		3-PhOPh	H	100	

氰戊菊酯 fenvalerate		3-PhOPh	CN	<0.06
氯氰菊酯 cypermethrin		3-PhOPh	CN	<0.06
甲氰菊酯 Fenpropathrin		3-PhOPh	CN	—
溴氰菊酯 deca-methrin		3-PhOPh	CN	—
三氟氯氰菊酯 eyhalothrin		3-PhOPh	CN	—

4: 稳定性与重复性实验

取高、中、低三个标准品浓度，在酶标板上重复 5 个数据测定其可重复性。测定 A 值基本一致，阴性孔变异系数 (CV%) 为 11%，阳性孔 CV% < 20%，均在允许范围内。由此可见本系统稳定性和重复性较好。

表 3 氯菊酯重复性测定结果

	1	2	3	4	5	标准品 (ppb)
A	1.228	1.252	1.236	1.326	1.180	0
B	0.950	0.993	0.998	0.982	1.001	0.1
C	0.788	0.720	0.870	0.779	0.763	50
D	0.159	0.199	0.172	0.196	0.194	1000

5: 回收率测定

加标土壤样品回收后进行 ELISA 检测，结果见下表。平均回收率为 71.4%。

表 5 ELISA 检测掺合样品结果 $\bar{X} \pm S$

氯菊酯掺含量 (ng/g)	检出量 (ng/g)
1.25	0.2
50	98.9
750	1241

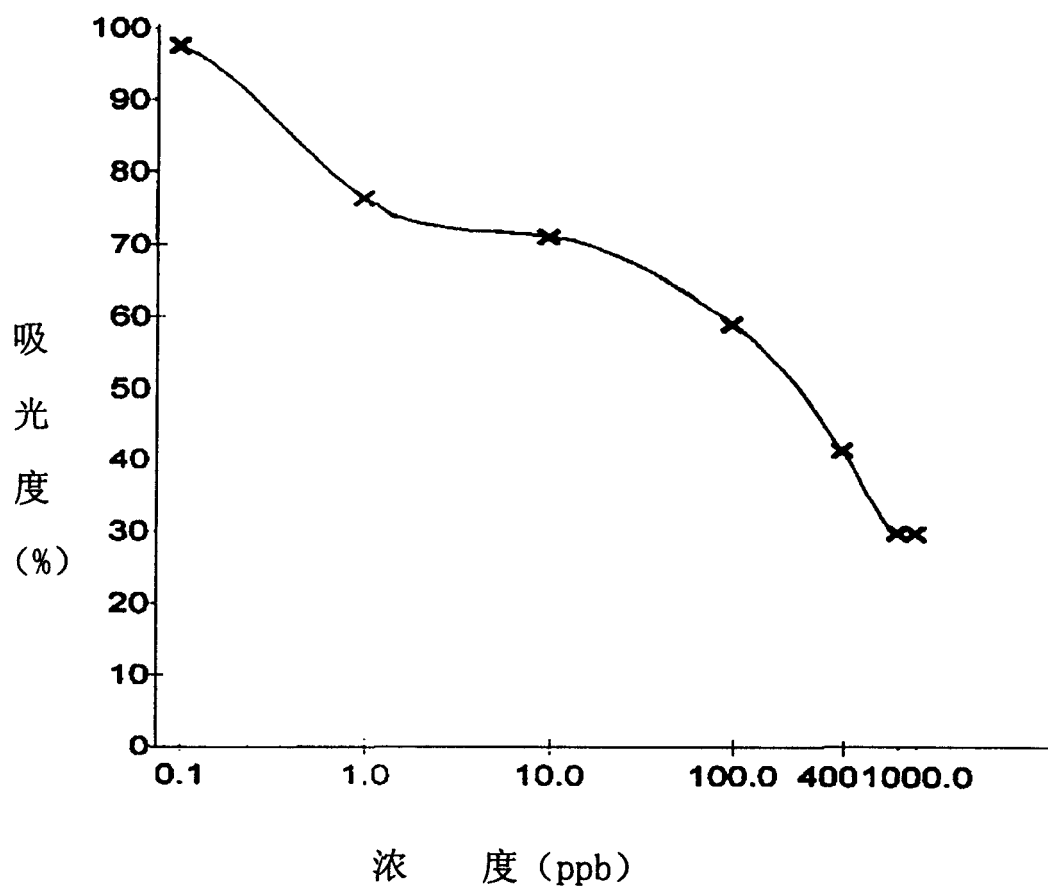


图 1

专利名称(译)	氯菊酯多克隆抗体酶联免疫检测方法		
公开(公告)号	CN1621839A	公开(公告)日	2005-06-01
申请号	CN200410066163.6	申请日	2004-12-10
[标]申请(专利权)人(译)	南京大学		
申请(专利权)人(译)	南京大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京理工大学学报		
[标]发明人	孙成 刘廷凤 塔娜 邹惠仙 赵晓联 张莲芬 杨敏娜 刘亚子 周芳 钟明		
发明人	孙成 刘廷凤 塔娜 邹惠仙 赵晓联 张莲芬 杨敏娜 刘亚子 周芳 钟明		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
代理人(译)	汪旭东		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种氯菊酯多克隆抗体酶联免疫检测方法，利用合成的氯菊酯免疫抗原免疫健康白兔得到多克隆抗体，筛选后以氯菊酯为标准品，以氯菊酯半抗原与OVA的偶联物作为包被抗原，建立土壤和食品中氯菊酯农药的间接竞争酶联免疫法。本发明建立了土壤和食品中氯菊酯农药的间接ELISA法，为氯菊酯在土壤和食品中的残留检测提供了快速高效的检测手段，由于采用的是多克隆抗体，费用较低并且稳定性和重复性较好。灵敏度为0.1ppb，线性范围为10~800ppb。免疫反应的高特异性和高亲和性使ELISA具有极高的选择性和灵敏性，样本前处理过程简单。

