

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/547

G01N 33/535

G01N 33/531



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410065106.6

[43] 公开日 2005 年 6 月 8 日

[11] 公开号 CN 1624479A

[22] 申请日 2004. 10. 20

[21] 申请号 200410065106.6

[71] 申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路 88 号

[72] 发明人 刘曙照 冯大和 徐维娜 张洪程

田子华 周达彪

[74] 专利代理机构 扬州苏中专利事务所

代理人 胡定华

权利要求书 2 页 说明书 5 页

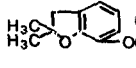
[54] 发明名称 固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒

[57] 摘要

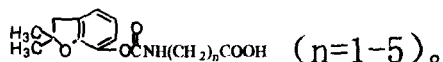
本发明涉及固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒。合成半抗原(见化学式)( $n=1-5$ )并与蛋白质共价偶联合成人工抗原,以人工抗原免疫动物制备对克百威具特异性亲和力的抗体,以辣根过氧化物酶标记半抗原。用所述抗体包被微孔板,加入待测样品(或克百威标样)与酶标半抗原的混合液,克百威、酶标半抗原与包被在微孔表面的抗体发生竞争性结合,洗涤去除游离物,加入酶的底物和显色剂,酶促显色反应的强度与样品(或标样)中克百威的含量成反比,据此建立固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析技术。运用该技术,在盒内设置相关试剂与材料,制备免疫检测试剂盒,用于农产品和环境等样本中残留克百威的快速检测。



ISSN 1008-4274

1、一种用于克百威快速检测的固相抗体直接竞争酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒，其特征是以   $\text{OCNH(CH}_2\text{)}_n\text{COOH}$  ( $n=1-5$ ) 为半抗原，与蛋白质共价偶联成人工抗原，以人工抗原免疫动物制备对克百威具特异性亲合力的抗体，以辣根过氧化物酶标记半抗原，用所述抗体包被聚苯乙烯微孔板，加入待测样品或克百威标样与酶标半抗原的混合液，克百威、酶标半抗原与包被在微孔表面的抗体发生竞争性结合，洗涤去除游离物，加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与结合在抗体上的酶标半抗原量成正比，与样品或标样中克百威的含量成反比，据此建立克百威直接竞争酶联免疫吸附分析技术，运用该技术，在盒内设置相关试剂与材料，制备免疫检测试剂盒，用于农产品与环境中残留克百威的快速检测。

2、根据权利要求 1 所述固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒，其特征是所述半抗原是以呋喃酚与光气反应生成氯甲酸呋喃酚酯，再与氨基酸缩合而成，其分子结构式为



3、根据权利要求 1 所述固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒，其特征是所述人工抗原是采用活性酯法或混合酸酐法将所述半抗原与蛋白质共价偶联而成。

4、根据权利要求 1 所述固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析分析技术及其试剂盒，其特征是所述抗体是以所述人工抗原与适量弗氏佐剂混合乳化后免疫兔、羊、鼠等动物制备的对克百威具有特异性亲合力的多克隆抗体或采用杂交瘤技术制备的对克百威具有特异性亲合力的单克隆抗体。

5、根据权利要求1所述固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒，其特征是所述酶标半抗原是采用混合酸酐法或活性酯法将所述半抗原与辣根过氧化物酶共价偶联而成。

6、根据权利要求1所述固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒，其特征是用所述抗体包被聚苯乙烯微孔板，以0.5%明胶封闭微孔表面未吸附抗体的位点。

7、根据权利要求1所述固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒，其特征是所述酶的底物为过氧化脲或过氧化氢。

8、根据权利要求1所述固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒，其特征是所述显色剂为3',3',5',5'-四甲基联苯胺（TMB）或邻苯二胺（OPD）。

9、根据权利要求1、2、3、4、5、6、7、8所述固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒，其特征是所述试剂盒由盒体，置于盒体内的可拆卸式聚苯乙烯微孔板、对克百威具特异性亲合力的抗体、缓冲液、封闭液、克百威标样、酶标半抗原、底物液、显色剂、终止液和使用说明书组成。

## 固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒

### 技术领域

本发明涉及固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒，主要应用于粮食、水果、蔬菜、茶叶等农产品和环境残留克百威的快速检测。

### 背景技术

克百威（商品名呋喃丹）是一种广谱高效的内吸性杀虫剂，广泛用于防治粮、棉、糖、烟、茶、蔬菜、水果等农作物的多种害虫、害螨和线虫，对韭菜等有一定增绿作用。克百威在土壤中残效期较长，植物通过根、茎、叶或种子吸收传导并输送到各器官，尤其是叶缘积累较多。与其他氨基甲酸酯类杀虫剂不同，克百威对胆碱酯酶活性的抑制不可逆，对人、畜禽、鱼、鸟、蜜蜂等毒性极高。残留在土壤中的克百威还可能通过径流和渗透污染水源。因此，建立高效快速的克百威检测技术，对于加强环境和农产品中残留克百威的监测及克百威中毒的快速诊断、保护农业生态环境、保障食品安全和人类健康具有重要意义。

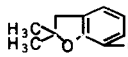
目前，残留克百威的分析主要依靠衍生化气相色谱法、高效液相色谱法和色质联用法。采用这些方法需要昂贵的仪器设备、专业化的实验室和训练有素的专门人才，对样品前处理的要求高、过程复杂、速度慢、选择性差，受检测灵敏度限制，难以适应大量样本和现场快速检测的要求。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种特异性强、灵敏度高、适合环境和农产品中

残留克百威快速检测的固相抗体直接竞争酶联免疫吸附分析技术。

本发明的又一个目的是提供一种特异性强、灵敏度高、廉价高效、适合环境和农产品中残留克百威现场快速检测的固相抗体直接竞争酶联免疫吸附分析试剂盒。

本发明的技术方案是：合成克百威半抗原   $\text{OCNH}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$  ( $n=1-5$ ) 并与载体蛋白质共价偶联合成人工抗原，以人工抗原免疫动物制备对克百威具特异性亲合力的抗体，以所获抗体包被聚苯乙烯微孔板，以辣根过氧化物酶标记半抗原。用所述抗体包被微孔板，加入待测样品（或克百威标样）与酶标半抗原的混合液，克百威、酶标半抗原与包被在微孔表面的抗体发生竞争性结合，洗涤去除游离物，加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与结合在抗体上的酶标半抗原量成正比，与样品（或标样）中克百威的含量成反比，从而建立克百威直接竞争酶联免疫吸附分析技术。运用该技术，在盒体内设置可拆卸式微孔板、对克百威具特异性亲合力的抗体、封闭液、克百威标样、酶标半抗原、缓冲液、底物液、显色剂、终止液和使用说明书，制备克百威免疫检测试剂盒，用于农产品与环境中残留克百威的快速检测。

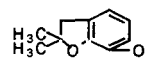
本发明的科学性强、技术先进，应用方法简便。本发明的基本依据是小分子化合物免疫分析化学原理和技术。分子量小于 5000 道尔顿的化合物一般不具备免疫原性，将克百威以半抗原的形式与蛋白质共价偶联制备人工抗原，以人工抗原免疫动物产生对克百威具特异性亲合力的抗体。小分子化合物虽然不具备免疫原性但具有反应原性，能与相应抗体在离体条件下发生免疫结合反应并符合质量作用定律。以辣根过氧化物酶标记克百威半抗原，在包被有抗体的微孔板的孔中加入待测样品（或克百威标样）与酶标半抗原的混合液，克百威、酶标半抗原与包被在微孔表面的抗体发

生竞争性结合反应，洗涤去除游离物后加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与结合在抗体上的酶标半抗原量成正比，与样品（或标样）中克百威的含量成反比，从而建立固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析技术。运用该技术，在盒体内设置相关试剂与材料，制备免疫检测试剂盒，用于环境和农产品中残留克百威的现场快速检测。试剂盒对克百威检测的线性浓度范围是  $10^{-3} \sim 10^0 \mu\text{g/mL}$ ，检测限  $0.2 \text{ ng/mL}$ 。通过参看说明书，专业人员可以现场检测操作，一般工作人员也可以进行现场检测分析，便于推广使用。

### 具体实施方式

#### 一、固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析技术实施例

1、以呋喃酚与光气（包括双光气、三光气）反应生成氯甲酸呋喃酚酯，

再与氨基酸缩合生成   $\text{OCNH(CH}_2\text{)}_n\text{COOH}$  ( $n=1-5$ )，以此为半抗原，采用活性酯法或混合酸酐法与牛血清白蛋白等共价偶联合成人工抗原。

2、以所述人工抗原与适量弗氏佐剂混合乳化后免疫兔、羊、鼠等动物制备对克百威具有特异性亲合力的多克隆抗体或采用杂交瘤技术制备对克百威具有特异性亲合力的单克隆抗体。

3、采用混合酸酐法或活性酯法将所述半抗原与辣根过氧化物酶共价偶联制备酶标半抗原。

4、用所述抗体包被聚苯乙烯微孔板，以 0.5%明胶封闭微孔表面未吸附抗体的位点。

5、以过氧化脲或过氧化氢为酶的底物，以 3', 3', 5', 5' -四甲基联苯胺 (TMB) 或邻苯二胺 (OPD) 为显色剂。

6、在包被好抗体的微孔板的孔中加入待测样品（或克百威标样）与酶标半抗原的混合液，克百威、酶标半抗原与包被在微孔表面的抗体发生

竞争性结合，洗涤去除游离物，加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与结合在抗体上的酶标半抗原量成正比，与样品（或标样）中克百威的含量成反比，据此建立克百威直接竞争酶联免疫吸附分析技术，对待测样品中的克百威进行定性定量快速检测。

## 二、固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析试剂盒制备实施例

1、微孔板的包被 将抗体用稀释 20 倍的缓冲液溶解成适当浓度，加入微孔板的孔中，100 $\mu$ L/孔，4 $^{\circ}$ C 吸附过夜。去除孔中的溶液，拍干，加入封闭液，150 $\mu$ L/孔，4 $^{\circ}$ C 封闭过夜或 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 小时，去除多余的封闭液，拍干，用稀释 20 倍的缓冲液洗 3 次，拍干，4 $^{\circ}$ C 条件下自然干燥，加干燥剂密封包装，4 $^{\circ}$ C 以下保存备用。也可将抗体、缓冲液、封闭液分别装入指定容器，置试剂盒内，由用户在使用前按使用说明自行包被。

2、克百威标样溶液的配制 准确称取克百威标样 0.0100g，溶于 100mL 乙腈，4 $^{\circ}$ C 保存。

3、酶标半抗原的制备 采用混合酸酐法或活性酯法将半抗原与辣根过氧化物酶共价偶联，透析去除游离的小分子化合物后保存于 50%的甘油中，包被抗体直接结合法测定酶标半抗原效价，制备试剂盒时将酶标半抗原用 50%甘油稀释至使用浓度的 100 倍，4 $^{\circ}$ C 以下保存。

4、缓冲液的配制 0.2mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  280 mL 加 0.2mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  720 mL、 $\text{NaN}_3$  2g 溶解混匀，4 $^{\circ}$ C 保存。

5、封闭液的配制 5.0g 明胶、0.5g  $\text{NaN}_3$  溶于 0.01mol/L、pH7.2 的磷酸盐缓冲液并定容至 1000mL，4 $^{\circ}$ C 保存。

6、底物液的配制 0.6g 过氧化脲溶于 1000mL 柠檬酸-磷酸盐缓冲液 (5.2g 柠檬酸、18.4g 磷酸氢二钠溶于蒸馏水并定容至 1000mL，4 $^{\circ}$ C 保存。

7、显色剂的配制 0.44g TMB 溶于 3.2mL 无水乙醇，用柠檬酸-磷酸

盐缓冲液定容至 1000mL, 充 N<sub>2</sub> 或减压脱气, 4℃ 保存。

8、终止液的配制 100mL 浓硫酸在搅拌下慢慢加入 800mL 蒸馏水中, 冷却。

9、试剂分装 各种试剂按要求配制, 测定合格后无菌分装。对克百威具特异性亲合力的抗体适量/瓶, 克百威标样 0.1mL/瓶、酶标半抗原 0.1mL/瓶、缓冲液 10mL/瓶、封闭液 16mL/瓶、底物液 6mL/瓶、显色剂 6mL/瓶、终止液 6mL/瓶。分装后贴标签, 注明批号和有效期, 4℃ 保存。

10、试剂盒组装 分别将可拆卸微孔板 1 块, 对克百威具特异性亲合力的抗体、克百威标样溶液、酶标半抗原、缓冲液、封闭液、底物液、显色剂、终止液各 1 瓶, 使用说明书 1 份置试剂盒内指定位置。也可事先将抗体包被在微孔板上并封闭, 置试剂盒内指定位置。试剂盒检验合格后封装, 4℃ 保存。

专利名称(译)	固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析技术及其试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN1624479A</a>	公开(公告)日	2005-06-08
申请号	CN200410065106.6	申请日	2004-10-20
[标]申请(专利权)人(译)	扬州大学		
申请(专利权)人(译)	扬州大学		
[标]发明人	刘曙照 冯大和 徐维娜 张洪程 田子华 周达彪		
发明人	刘曙照 冯大和 徐维娜 张洪程 田子华 周达彪		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/535 G01N33/547		
代理人(译)	胡定华		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析方法及其试剂盒。合成半抗原(见化学式)( $n=1-5$ )并与蛋白质共价偶联成人工抗原，以人工抗原免疫动物制备对克百威具特异性亲和力的抗体，以辣根过氧化物酶标记半抗原。用所述抗体包被微孔板，加入待测样品(或克百威标样)与酶标半抗原的混合液，克百威、酶标半抗原与包被在微孔表面的抗体发生竞争性结合，洗涤去除游离物，加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与样品(或标样)中克百威的含量成反比，据此建立固相抗体直接竞争克百威酶联免疫吸附分析技术。运用该技术，在盒内设置相关试剂与材料，制备免疫检测试剂盒，用于农产品和环境等样本中残留克百威的快速检测。

