



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104330552 B

(45)授权公告日 2016.09.21

(21)申请号 201410669510.8

(22)申请日 2014.11.20

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104330552 A

(43)申请公布日 2015.02.04

(73)专利权人 山东农业大学

地址 271018 山东省泰安市岱宗大街61号

(72)发明人 徐志祥 时辰 高绘菊

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

审查员 肖吉

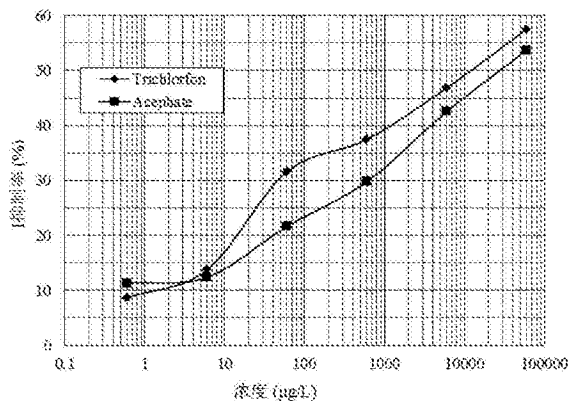
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种酶标记仿生免疫分析检测敌百虫和乙酰甲胺磷的方法

(57)摘要

本发明涉及一种酶标记仿生免疫分析检测敌百虫和乙酰甲胺磷的方法,包括半抗原的合成、酶标抗原的制备、多识别位点亲水性分子印迹聚合物膜的制备以及标准曲线的建立等步骤。本发明是以制备的亲水性印迹聚合物膜作为仿生抗体代替生物抗体,利用免疫吸附测定原理,建立对敌百虫或乙酰甲胺磷具有广泛检测范围的高灵敏检测方法。克服了传统生物抗体制备周期长、易失活、成本高等缺点,可大大缩短了分析时间。本发明成本低廉,实验操作简单,灵敏度高,适用于各种农产品中敌百虫或乙酰甲胺磷的快速检测。



1. 一种酶标记仿生免疫分析检测敌百虫或乙酰甲胺磷方法,其特征包括以下步骤:

1) 有机磷农药通用半抗原的合成:冰浴条件下将0.005-0.02mol 4-氨基丁酸溶于5-10mL 2.5mol/L氢氧化钠溶液中,完全溶解后向上述溶液中滴加1.215mL 0,0'-二甲基硫代磷酰氯,室温下磁力搅拌器搅拌6h;洗涤去除杂质,并用浓度为1.0mol/L盐酸调节反应溶液pH值至2.0;10-20mL乙酸乙酯萃取三次后向有机相加入无水硫酸钠过夜干燥,旋蒸得有机磷农药通用半抗原4-(二甲氧基硫代磷酰胺基)丁酸;

2) 酶标抗原的制备:将步骤1)制备的有机磷农药通用半抗原4-(二甲氧基硫代磷酰胺基)丁酸0.03-0.05mmol溶于600-800 μ L二甲基亚砷中,然后加入3.4mg N-羟基琥珀酰亚胺和12.4mg N,N'-二环己基碳酰亚胺,室温搅拌反应2-4h,离心取上清液,得到溶液A;将5-10mg辣根过氧化物酶溶解于1-2mL浓度50mmol/L K_2HPO_4 溶液中作为溶液B;冰浴条件下,将50-200 μ L溶液A缓慢逐滴加入溶液B中,边滴加边摇动;4 $^{\circ}$ C反应8-12h,取出后用磷酸盐缓冲溶液PBS透析1-3天,收集透析液得到酶标抗原标准溶液,4 $^{\circ}$ C保存备用;

5倍PBS溶液组分为:由 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$:68.80g、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$:8.97g和NaCl:45.00g,加双蒸水定容至1L组成;将5倍PBS用双蒸水稀释5倍即为PBS溶液;

3) 多识别位点水相分子印迹膜的制备:4-8mL超纯水、3-6mL二甲基亚砷和8-15mL乙腈的混合溶剂体系中分别加入摩尔比1:3:4-6所述的有机磷农药通用半抗原4-(二甲氧基硫代磷酰胺基)丁酸、甲基丙烯酸和二甲基丙烯酸乙二醇酯,然后加入10-20mg偶氮二异丁腈,搅拌反应0.5-2h;96孔酶标板上每孔加入200 μ L搅拌反应后的混合液,氮气保护条件下20-60 $^{\circ}$ C聚合反应12-24h,用体积比3-9:1甲醇/冰乙酸溶液超声洗脱4-10h后用浓度100%甲醇溶液洗脱2-4h,干燥后得多识别位点水相印迹聚合物膜;

4) 多残留酶标记仿生免疫分析方法的建立:步骤3)制备的水相印迹聚合物膜作为仿生抗体;步骤2)制备的酶标抗原标准溶液用PBS溶液稀释5000倍,作为酶标稀释液;

将96孔酶标板第1行设为空白组,每孔只加200 μ L PBS溶液;第2行设为对照组,每孔加100 μ L酶标稀释液和100 μ L PBS溶液;第3-8行每孔依次分别加入敌百虫或乙酰甲胺磷标样梯度稀释液和100 μ L酶标稀释液;室温孵育1h后用磷酸盐吐温缓冲液PBST洗板五次;96孔酶标板每孔加入100-200 μ L底物液,室温下反应30-60min;每孔加入50-100 μ L 1.25mol/L硫酸,终止反应;用酶标仪读取96孔酶标板第1-8行吸光度值A,分别计算抑制率;

以敌百虫或乙酰甲胺磷标样梯度稀释液浓度的对数值为横坐标,相应的抑制率百分数为纵坐标,分别绘制标准曲线;

PBST溶液的组分为:5倍PBS 200mL,10%的Tween-20:5mL,加双蒸水定容至1L;

所述底物液的配制为:底物A:8.2g无水醋酸钠、2.5g β -环糊精和150mg过氧化氢脲,加双蒸水定容至1000mL,调pH至5.0,4 $^{\circ}$ C保存;底物B:50mg3,3,5,5-四甲基联苯胺溶于5mL二甲基亚砷,室温避光保存;使用前15min,取14.6mL底物A和0.45mL底物B混合成底物液;

5) 称取1-2g待测样品,粉碎后加入5-10mL PBS溶液超声提取3次,过滤得样品提取液;将样品提取液代替步骤4)中所述敌百虫或乙酰甲胺磷标样梯度稀释液,重复步骤4)操作,根据抑制率由标准曲线计算出待测物中敌百虫或乙酰甲胺磷的含量。

一种酶标记仿生免疫分析检测敌百虫和乙酰甲胺磷的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种酶标记仿生免疫分析检测敌百虫和乙酰甲胺磷的方法,属于食品安全检测技术领域,特别是一种敌百虫和乙酰甲胺磷等有机磷农药多残留的快速、灵敏检测方法。

背景技术

[0002] 有机磷农药是一类作用于农作物用以杀灭以及防止病虫害的有机化合物杀虫剂。经毒理学实验表明,其通过消化道、呼吸道等途径进入人畜体内后会造成神经疾病,具有神经毒性。部分有机磷农药经过转化会形成新物质,如敌百虫经转化后成为敌敌畏,毒性增强,对环境及动物造成更大危害。

[0003] 目前为止,传统的有机磷农药检测方法包括气相色谱法、液相色谱法、气相色谱与质谱联用法、酶联免疫分析法等对有机磷农药进行定性及定量检测。常规大型仪器及设备具有使用地域局限性,检测耗时长,分析过程繁琐等缺点,很难适用于现场快速检测及批量样品的快速测定。酶联免疫法虽然具有较高灵敏度和较低检出限,但其抗体制备困难且不易保存容易失活。因此将有机磷农药通用半抗原4-(二甲氧基硫代磷酰胺基)丁酸分子印迹聚合物作为公共模板合成仿生抗体,建立酶标记仿生免疫吸附分析技术用于有机磷农药多残留检测,具有成本低,制备周期短,不易失活,容易保存等优点,对于保障蔬菜产品安全具有重要意义。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服传统的有机磷农药检测方法存在检测时间长、仪器价格昂贵、特异性抗体难制备、农药检测种类单一等缺陷,提供一种酶标记仿生免疫分析检测敌百虫和乙酰甲胺磷的方法。

[0005] 一种酶标记仿生免疫分析检测敌百虫和乙酰甲胺磷的方法,包括以下步骤:

[0006] 1.有机磷农药通用半抗原的合成:冰浴条件下将0.005-0.02mol 4-氨基丁酸溶于5-10mL 2.5mol/L氢氧化钠溶液中,完全溶解后向上述溶液中滴加1.215mL 0,0'-二甲基硫代磷酰氯,室温下磁力搅拌器搅拌6h。洗涤去除杂质,并用浓度为1.0mol/L盐酸调节反应溶液pH值至2.0。10-20mL乙酸乙酯萃取三次后向有机相加入无水硫酸钠过夜干燥,旋蒸得有机磷农药通用半抗原(4-(二甲氧基硫代磷酰胺基)丁酸)。

[0007] 2.酶标抗原的制备:将步骤1)制备的有机磷农药通用半抗原0.03-0.05mmol溶于600-800 μ L二甲基亚砷中,然后加入3.4mg N-羟基琥珀酰亚胺和12.4mg N,N'-二环己基碳酰亚胺,室温搅拌反应2-4h,离心取上清液,得到溶液A。将5-10mg辣根过氧化物酶溶解于1-2mL浓度50mmol/L K_2HPO_4 溶液中作为溶液B。冰浴条件下,将50-200 μ L溶液A缓慢逐滴加入溶液B中,边滴加边摇动。4 $^{\circ}C$ 反应8-12h,取出后用磷酸盐缓冲溶液PBS透析1-3天,收集透析液得到酶标抗原标准溶液,4 $^{\circ}C$ 保存备用。

[0008] 所述5倍PBS溶液组分为:由 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$:68.80g、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$:8.97g和NaCl:

45.00g,加双蒸水定容至1L组成;将5倍PBS用双蒸水稀释5倍即为PBS溶液。

[0009] 3.多识别位点水相分子印迹膜的制备:4-8mL超纯水、3-6mL二甲基亚砷和8-15mL乙腈的混合溶剂体系中分别加入摩尔比1:3:4-6所述的有机磷农药通用半抗原、甲基丙烯酸和二甲基丙烯酸乙二醇酯,然后加入10-20mg偶氮二异丁腈,搅拌反应0.5-2h。96孔酶标板上每孔加入200 μ L上述混合液,氮气保护条件下20-60 $^{\circ}$ C聚合反应12-24h,用体积比3-9:1甲醇/冰乙酸溶液超声洗脱4-10h后用浓度100%甲醇溶液洗脱2-4h,干燥后得多识别位点水相印迹聚合物膜。

[0010] 4.多残留酶标记仿生免疫分析方法的建立:步骤3)制备的水相印迹聚合物膜作为仿生抗体;步骤2)制备的酶标抗原标准溶液用PBS溶液稀释5000倍,作为酶标稀释液。

[0011] 将96孔酶标板第1行设为空白组,每孔只加200 μ L PBS溶液;第2行设为对照组,每孔加100 μ L酶标稀释液和100 μ L PBS溶液;第3-8行每孔依次分别加入敌百虫或乙酰甲胺磷标样梯度稀释液和100 μ L酶标稀释液。室温孵育1h后用磷酸盐吐温缓冲液PBST洗板五次。96孔酶标板每孔加入100-200 μ L底物液,室温下反应30-60min。每孔加入50-100 μ L 1.25mol/L硫酸,终止反应;用酶标仪读取96孔酶标板第1-8行吸光度值A,分别计算抑制率;

[0012] 以敌百虫或乙酰甲胺磷标样梯度稀释液浓度的对数值为横坐标,相应的抑制率百分数为纵坐标,分别绘制标准曲线。

[0013] 所述5倍PBST溶液的组分为:200mL,10%的Tween-20:5mL,加双蒸水定容至1L;将5倍PBST用双蒸水稀释5倍即为PBST溶液。

[0014] 所述底物液的配制为:底物A:8.2g无水醋酸钠、2.5g β -环糊精和150mg过氧化氢脲,加双蒸水定容至1000mL,调pH至5.0,4 $^{\circ}$ C保存;底物B:50mg3,3,5,5-四甲基联苯胺溶于5mL二甲基亚砷,室温避光保存;使用前15min,取14.6mL底物A和0.45mL底物B混合成底物液。

[0015] 5.称取1-2g待测样品,粉碎后加入5-10mL PBS溶液超声提取3次,过滤得样品提取液。将样品提取液代替步骤4)中所述敌百虫或乙酰甲胺磷标样梯度稀释液,重复步骤4)操作,根据抑制率由标准曲线计算出待测物中敌百虫或乙酰甲胺磷的含量。

[0016] 本发明的优点和积极效果是:

[0017] 1.本发明提供的基于有机磷农药通用半抗原的仿生抗体具有较高的选择性,可以代替传统生物抗体应用于酶联免疫分析技术;该仿生抗体由化学方法制备,具有较高的稳定性、较长的使用寿命和较强的抗恶劣环境的能力,克服了传统生物抗体制备周期长、易失活、成本高等缺点。

[0018] 2.本发明将分子印迹技术与免疫分析技术联用,建立对敌百虫和乙酰甲胺磷具有高灵敏度的酶标记仿生免疫分析方法。该方法的最低检出限与传统生物抗体建立的酶联免疫方法最低检出限接近,满足检测需要。并且大大缩短了分析时间,适用于有机磷农药多残留的快速检测。

[0019] 3.本发明制备的仿生抗体可以重复使用10次以上,成本大大降低;并且前处理简单,灵敏度高,实验操作简单,适用于蔬菜中有机磷农药多残留的快速检测。

附图说明

[0020] 图1为敌百虫和乙酰甲胺磷的酶标记仿生免疫分析方法标准曲线。

[0021] 由图1可知,该分析方法对敌百虫的最低检出限为 $8\mu\text{g/L}$,对乙酰甲胺磷的最低检出限为 $12.0\mu\text{g/L}$,满足检测需要。

具体实施方式

[0022] 下面结合实施例,对本发明进一步说明;下述实施例是说明性的,不是限定性的,不能以下述实施例来限定本发明的保护范围。

[0023] 本发明是将有机磷农药通用半抗原作为模板分子合成分子印迹聚合物膜作为仿生抗体应用于酶标记免疫分析技术,从而建立一种有机磷通用半抗原酶标记仿生免疫分析方法,用于对蔬菜等农产品中敌百虫和乙酰甲胺磷的检测。其具体实施例为:

[0024] 1.有机磷农药通用半抗原的合成:向 4°C 冰浴环境中的 10mL 2.5mol/L 的氢氧化钠溶液中加入 0.01mol 4-氨基丁酸,磁力搅拌 30min 后加入 1.215mL $0,0'$ -二甲基硫代磷酰氯,在室温下继续搅拌 6h 。洗涤去除杂质,并用浓度为 1.0mol/L 盐酸调节反应溶液 pH 值至 2.0 。调节后的溶液体系用 25mL 乙酸乙酯萃取三次,取有机相并用无水硫酸钠干燥过夜,最后旋转蒸发得到有机磷农药通用半抗原。

[0025] 2.酶标抗原的制备:将制备的有机磷农药通用半抗原 0.03mmol 溶于 $618\mu\text{L}$ 二甲基亚砜中,然后加入 3.4mg N-羟基琥珀酰亚胺和 12.4mg N,N'-二环己基碳酰亚胺,室温搅拌反应 4h ,离心取上清液,得到溶液A。将 10mg 辣根过氧化物酶溶解于 2mL 50mmol/L K_2HPO_4 作为溶液B。冰浴条件下,将 $100\mu\text{L}$ 溶液A缓慢逐滴加入溶液B中,边滴加边用手摇动烧瓶。 4°C 反应 10h ,取出后用磷酸盐缓冲溶液PBS透析 3天 ,收集透析液得到酶标抗原标准溶液, 4°C 保存备用。

[0026] 3.多识别位点亲水性分子印迹膜的制备: 4mL 超纯水、 4mL 二甲基亚砜和 12mL 乙腈的混合溶剂体系中加入 0.908g 4-(二甲氧基硫代磷酰胺基)丁酸、 1.033g 甲基丙烯酸、 3.236g 二甲基丙烯酸乙二醇酯和 100mg 偶氮二异丁腈,磁力搅拌 60min ,超声脱气 10min 。向96孔酶标板中每孔加入 $200\mu\text{L}$ 脱气后的混合溶液,在 38°C 氮气环境下避光反应 18h 。弃去反应液,用 300mL 体积比为 $3:1$ 的甲醇/醋酸溶液洗脱 12h ,再用 300mL 浓度 100% 甲醇洗脱 6h 。 38°C 条件下干燥 4h ,得多识别位点水相印迹聚合物膜。

[0027] 4.多残留酶标记仿生免疫分析方法的建立:步骤3)制备的水相印迹聚合物膜作为仿生抗体;步骤2)制备的酶标抗原标准溶液用PBS溶液稀释 5000 倍,作为酶标稀释液。

[0028] 将96孔酶标板第1行酶标孔设为空白组,每孔只加 $200\mu\text{L}$ PBS溶液;第2行设为对照组,每孔加 $100\mu\text{L}$ 酶标稀释液和 $100\mu\text{L}$ 磷酸盐缓冲溶液;第3-8行每孔依次加入 $100\mu\text{L}$ $0.6, 6, 60, 600, 6000$ 和 6000mg/L 敌百虫或乙酰甲胺磷标样梯度稀释液,然后立即每孔再加入 $100\mu\text{L}$ 酶标稀释液。室温孵育 1h 后用磷酸盐吐温缓冲液PBST(5 倍PBS: 200mL , 10% 的Tween-20: 5mL ,加双蒸水定容至 1L 。)洗板五次。96孔酶标板每孔加入 $150\mu\text{L}$ 底物液,室温下反应 30min 。每孔加入 $50\mu\text{L}$ 1.25mol/L 硫酸,终止反应。

[0029] 在双波长($450-650\text{nm}$)下用酶标仪读取96孔酶标板第1-8行吸光度值A,分别计算抑制率。以上述敌百虫或乙酰甲胺磷标样梯度稀释液浓度的对数值为横坐标,抑制率百分数为纵坐标,绘制分析方法的标准曲线,建立仿生免疫分析方法。

[0030] 5.准确称取 2.0g 芦笋,切碎后放置于 100mL 烧杯中,加入 10.0mL PBS溶液超声提取三次,每次提取 10min ,合并提取液用PBS溶液定容到 50mL , $0.45\mu\text{m}$ 膜过滤得到的样品提取

液。将样品提取液代替步骤4)所述的敌百虫或乙酰甲胺磷标样梯度重复步骤4)的操作进行BELISA分析。根据吸光度值计算出芦笋提取液的抑制率,由步骤4)中绘制的标准曲线查出所测芦笋提取液中敌百虫或乙酰甲胺磷浓度为4.4mg/L(乙酰甲胺磷浓度为13.0mg/L),因此芦笋中敌百虫含量为0.11mg/g(乙酰甲胺磷含量为0.325mg/g)。

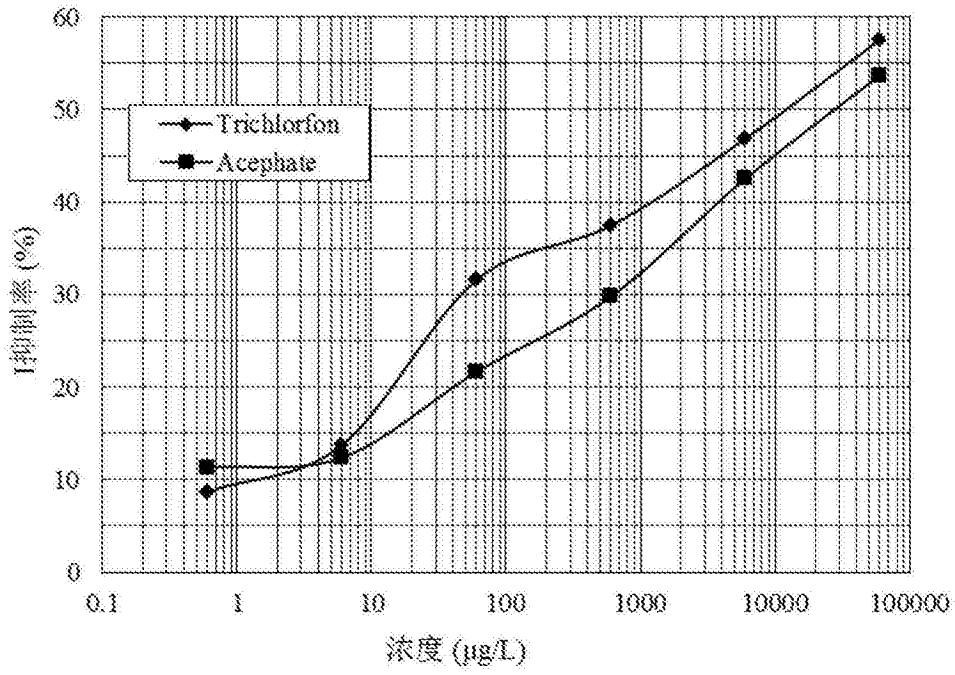


图1

专利名称(译)	一种酶标记仿生免疫分析检测敌百虫和乙酰甲胺磷的方法		
公开(公告)号	CN104330552B	公开(公告)日	2016-09-21
申请号	CN201410669510.8	申请日	2014-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
[标]发明人	徐志祥 时辰 高绘菊		
发明人	徐志祥 时辰 高绘菊		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/535		
审查员(译)	肖吉		
其他公开文献	CN104330552A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种酶标记仿生免疫分析检测敌百虫和乙酰甲胺磷的方法，包括半抗原的合成、酶标抗原的制备、多识别位点亲水性分子印迹聚合物膜的制备以及标准曲线的建立等步骤。本发明是以制备的亲水性印迹聚合物膜作为仿生抗体代替生物抗体，利用免疫吸附测定原理，建立对敌百虫或乙酰甲胺磷具有广泛检测范围的高灵敏检测方法。克服了传统生物抗体制备周期长、易失活、成本高等缺点，可大大缩短了分析时间。本发明成本低廉，实验操作简单，灵敏度高，适用于各种农产品中敌百虫或乙酰甲胺磷的快速检测。

