

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/535 G01N 33/543

G01N 33/577



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02148534.8

[43] 公开日 2003 年 4 月 30 日

[11] 公开号 CN 1414390A

[22] 申请日 2002.12.13 [21] 申请号 02148534.8

[71] 申请人 江苏省农业科学院植物保护研究所
地址 210014 江苏省南京市孝陵卫钟灵街 50 号

[72] 发明人 刘贤金 颜春荣 董 键 余向阳

[74] 专利代理机构 南京众联专利代理有限公司
代理人 孙忠浩

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 氟虫腈免疫检测方法

[57] 摘要

本发明涉及一种氟虫腈免疫检测方法，其特征是将包被抗原稀释液温育处理；加入封闭液，温育；将预先处理的样品与等体积的酶标抗体混合，温育；取出酶标板，加入底物液，温育；加入硫酸溶液终止反应；在 450nm 波长下，测定 OD 值，并设定通过检测确定样品中的氟虫腈含量。本发明的优点是可以在环境监控、食品、农药毒理或药理等应用或研究领域使用。由于本方法可以直接对样品进行检测，具有操作简单，测试过程短、流动性强、特别适合于基层及市场监测部门对水产品、蔬菜食品领域中的污染情况进行快速检测。

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

- 1、一种氟虫腈免疫检测方法，其特征在于：
 - a、在 96 微孔板内每孔加入 100ul 包被抗原稀释液，4℃过夜或 37℃温育 2 小时；
 - b、取出 96 微孔板，弃去包被液，用 PBST 洗涤三次，甩干，并在每孔中加入 200ul 封闭液，37℃温育 1 小时；
 - c、取出酶标板，用 PBST 洗涤三次，甩干，A₁₋₆、B₁₋₆、C₁₋₆ 依序将预先处理的样品与等体积酶标抗体混合液混合，每孔 100ul，A₇、B₇、C₇ 孔加入 100 ul 的 PBS，A₈、B₈、C₈ 加入 50ul 的抗体和 50ul 的 PBS，37℃温育 2 小时；
 - d、取出酶标板，用 PBST 洗涤三次，甩干，每孔中加入现配的底物液 100ul，37℃温育 15 分钟；
 - e、每孔中加入 50ul 的 2M 硫酸溶液终止反应；
 - f、终止反应后，立即用吸水纸吸干酶标板底部，将酶标板置于酶标仪上，在 450nm 波长下，以 A₈、B₈、C₈ 孔为空白调零，测定各孔的 OD 值；
 - g、设定 A₈、B₈、C₈ 孔的平均值调零，以 A₇、B₇、C₇ 的平均值为 B₀，同时测定 A、B、C 孔 1~6 各列的平均值，确定样品中的氟虫腈含量。
- 2、根据权利要求 1 所述的氟虫腈免疫检测方法，其特征在于：步骤 C 中在加入预先处理好的样品与等体积抗体的混合液，37℃温育 2 小时后，取出酶标板，用 PBST 洗涤、甩干，于每孔中加入 100ul 酶标 SPA 稀释液，37℃温育 45 分钟后，再进行后序测试。
- 3、根据权利要求 1 或 2 所述的氟虫腈免疫检测方法，其特征在于：所述的包被液是采用氟虫腈改型并与卵清蛋白偶联形成。
- 4、根据权利要求 1 或 2 所述的氟虫腈免疫检测方法，其特征在于：所述的样品为蔬果类，应定量后用丙酮与水以 95: 5 进行提取，将提取液净化和浓缩，处理后的样品与等体积抗体混合，进行检测。
- 5、根据权利要求 1 或 2 所述的氟虫腈免疫检测方法，其特征在于：所述的样品为液体质，则去除悬浮杂物，处理后的样品与等体积抗体混合液进行检测。
- 6、根据权利要求 4 或 5 所述的氟虫腈免疫检测方法，其特征在于：所述的抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。

氟虫腈免疫检测方法

技术领域：

本发明涉及一种氟虫腈免疫检测方法。

背景技术：

氟虫腈是一种新型苯吡唑类杀虫剂，在我国有良好的应用前景，但研究表明其作为一种慢性神经毒性，在 300ppm 的经口剂量时，可致小鼠甲状腺癌，被定为 C 类致癌物质，尤其是其在环境中的代谢缓慢，有两种代谢物比亲体农药对哺乳动物的毒性高 10 倍以上，且在生物体脂肪内有富集作用，尤其该农药对水生甲壳类动物剧毒，对蜜蜂毒性强，是一种生态环境毒负作用较大的农药，很有必要对该农药加强应用后的监管。

何艺兵于 2000 年在《农药科学管理》第 3 期上公开了一种气相色谱分析法，仪器设备要求比较高，测试前还需对样品作必要的提取和净化，不仅所需时间长，样品提取方法复杂，且亲体农药和代谢物检测条件不同，需要多残留检测，很不方便。

朱国念等 2000 年在《农药学学报》第 2 期报道了类似氟虫腈模拟稻田生态第中降解途径研究，其分析方法中也需要对样品进行提取和净化，并进行色谱检测，采用本方法对氟虫腈及代谢物对实测水、土和水稻植株的最低检出浓度分别为：0.028—0.37mg/L、0.001—0.008mg/kg 和 0.001—0.009mg/kg。

国外也有学者对氟虫腈的检测技术也展开研究，公开了一些关于气相色谱或色谱—质谱联用的检测方法，最低检出浓度为 0.005mg/kg。平均回收率为 85.4—95.8%，变异系数为 2.3—12.0%，检测结果一般需要两天，检测过程复杂。

发明内容：

本发明的目的在于：针对目前对氟虫腈免疫的检测中存在的实际问题，提供一种新的氟虫腈免疫检测方法。

本发明的目的是这样实现的：一种氟虫腈免疫检测方法，其特征在于：

- a、在 96 微孔板内每孔加入 100ul 包被液，4℃过夜或 37℃温育 2 小时；
- b、取出 96 微孔板，弃去包被液，用 PBST 洗涤三次，甩干，并在每孔中加入 200ul 封闭液，37℃温育 1 小时；

c、取出酶标板，用 PBST 洗涤三次，甩干，A₁₋₆、B₁₋₆、C₁₋₆ 依序将预先处理的样品与等体积酶标抗体混合液混合，每孔 100ul，A₇、B₇、C₇ 孔加入 100 ul 的 PBS，A₈、B₈、C₈ 加入 50ul 的抗体和 50ul 的 PBS，37℃温育 2 小时；

d、取出酶标板，用 PBST 洗涤三次，甩干，每孔中加入现配的底物液 100ul，37℃温育 15 分钟；

e、每孔中加入 50ul，2M 硫酸溶液终止反应；

f、终止反应后，立即用吸水纸吸干酶标板底部，将酶标板置于酶标仪上，在 450nm 波长下，以 A₈、B₈、C₈ 孔为空白调零，测定各孔的 OD 值；

g、设定 A₈、B₈、C₈ 孔的平均值调零，以 A₇、B₇、C₇ 的平均值为 B₀ 同时测定 A、B、C 孔 1~6 各列的平均值，确定样品中的氟虫腈含量。

酶标板各孔的样品、标准品（标样）、对照、空白孔的具体位置参见表一。

表一：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	对 照	空 白				
B	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	对 照	空 白				
C	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	对 照	空 白				
D	标样 1	标样 2	标样 3	标样 4	标样 5	标样 6						
E	标样 1	标样 2	标样 3	标样 4	标样 5	标样 6						
F	标样 1	标样 2	标样 3	标样 4	标样 5	标样 6						
G												
H												

本发明优点在于：本方法可以在环境监控、食品安全、农药毒理或药理等应用或研究领域使用，由于本方法可以直接对样品进行检测，具有操作简单，测试过程短，流动性强，适合基层及市场监测部门对水产品、蔬菜食品领域中的污染情况进行快速检测。

具体实施方式：

本发明包括固相抗原间接 ELISA 和直接 ELISA 两种类型。间接 ELISA 的测定原理为：将锐劲物半抗原—蛋白复合物与固相载体（聚苯乙烯微量滴定板）结合；洗除未吸附抗原，加入待测氟虫腈（标样或样品）和抗体混合液，竞争温育后，在固相载体表面形成抗原—抗体复合物；洗除未与固相抗原结合的抗体，然后加入酶标 SPA 后加入酶底物，在酶的催化作用下，底物发生降解反应，产生有色产物，通过酶标仪检测出酶底物的降解量（多少以显色后的 OD 值高低表示），酶量与所加的氟虫腈含量呈负相关，根据标样浓度与所得的相应的 OD 值，并经数学换算后可得一条标准曲线。对于未知样品，只要在同样条件下测定反应后的 OD 值，就可以根据标准曲线，用内插法得知氟虫腈的含量。直接 ELISA 是将酶直接标记到抗体上，使固相抗原和游离抗原直接与酶标抗体竞争反应，使得测定时间大大缩短。

实施例 1：包被抗原的制备方法。

先把氟虫腈吡啶环上的腈基改造成羧基利用活化酯法把羧基与卵清蛋白的氨基进行偶联，得到氟虫腈—卵清蛋白偶联物，获得包被抗原稀释抗原。

实施例 2：固相间接检测步骤。

1、包被：在 96 微孔板内每孔加入 100ul 包被液，4℃过夜或 37℃温育 2 小时；

2、封闭：取出 96 微孔板，弃去包被液，用 PBST 洗涤三次，甩干，并在每孔中加入 200ul 封闭液，37℃温育 1 小时；

3、加样：取出酶标板，用 PBST 洗涤三次，甩干，将样品去除悬浮杂物后，与等体积抗体混合液混合，按表一所示注入 96 微孔板内，每孔 100ul，同时，酶标板 A₇、B₇、C₇ 孔加入 100ul 的 PBS，A₈、B₈、C₈ 加入 50ul 的抗体和 50ul 的 PBS，37℃温育 2 小时；

4、加酶标 SPA：取出酶标板，用 PBST 洗涤，甩干，于每孔中加入 100ul

酶标 SPA 稀释液，37℃温育 45 分钟；

5、加底物液：取出酶标板，用 PBST 洗涤三次，甩干。于每孔中加入现配的底物液，37℃温育 15 分钟。

6、终止反应：每孔中加入 50 μ l 2M 硫酸溶液终止反应。

7、读数，加硫酸后立即用吸水纸吸干纸吸干酶标板底部，将酶标板置于酶标仪上，在 450nm 波长下，以 A8、B8、C8 孔为空白调零，测定各孔的 OD 值。

8、设定对照孔 A7、B7、C7 孔的 OD 值的平均值为 B_0 ，1 至 6 列的 A、B、C 孔的 OD 值平均值为 B ($n=1, 2, 3, 4, 5, 6$)，同一样品的重复孔的 OD 值平均值为 B_{yp} (yp 代表不同的样品)。每组数据都以三次重复的平均值为准。以氟虫腈标样浓度的常用对数 $\log[c]$ 为横坐标 (X)，对应的抑制率 $I=100\%[(B_0-B_{yp})/B_0]$ 为纵坐标 (Y)，可得一条 $Y=a+bx$ 直线。将 B_{yp} 经换算成 Y_{yp} ，然后代入直线中，可得 X_{yp} ，对 X_{yp} 取反对数，即可得知样品中氟虫腈含量 C_{yp} 。

实施时，所述的抗体可以采用单克隆抗体也可以采用多克隆抗体，所述的样品可以采用蔬果类或液体质。在本实施例中，所述的抗体为单克隆抗体，所述的样品为液体质。

实施例 3：固相直接检测步骤。

1、包被：在 96 微孔板内每孔加入 100 μ l 包被抗原稀释液，4℃过夜或 37℃温育 2 小时；

2、封闭：取出 96 微孔板，弃去包被液，用 PBST 洗涤三次，甩干，并在每孔中加入 200 μ l 封闭液，37℃温育 1 小时；

3、加样：取出酶标板，用 PBST 洗涤三次，甩干，将样品用丙酮与水以 95:5 进行提取，将提取液净化和浓缩，处理后的样品与等体积抗体混合液混合，按表一所示注入 96 微孔板内，每孔 100 μ l，同时，酶标板 A7、B7、C7 孔加入 100 μ l 的 PBS，A8、B8、C8 加入 50 μ l 的抗体和 50 μ l 的 PBS，37℃温育 2 小时。

4、加底物液：取出酶标板，用 PBST 洗涤三次，甩干。于每孔中加入现配的底物液，37℃温育 15 分钟。

5、终止反应：每孔中加入 50 μ l 的 2M 硫酸溶液终止反应。

6、读数，加硫酸后立即用吸水纸吸干纸吸干酶标板底部，将酶标板置于酶标仪上，在 450nm 波长下，以 A8、B8、C8 孔为空白调零，测定各孔的 OD 值。

7、设定对照孔 A7、B7、C7 孔的 OD 值的平均值为 B_0 ，1 至 6 列的 A、B、

C 孔的 OD 值平均值为 B (n=1, 2, 3, 4, 5, 6), 同一样品的重复孔的 OD 值平均值为 B_{yp} (y_p 代表不同的样品)。每组数据都以三次重复的平均值为准。以氟虫腈标样浓度的常用对数 $\log[c]$ 为横坐标 (X), 对应的抑制率 $I=100\%[(B_0-B_{yp})/B_0]$ 为纵坐标 (Y), 可得一条 $Y=a+bx$ 直线。将 B_{yp} 经换算成 Y_{yp} , 然后代入直线中, 可得 X_{yp} , 对 X_{yp} 取反对数, 即可得知样品中氟虫腈含量 C_{yp} 。

实施时, 所述的抗体可以采用多克隆抗体或单克隆抗体, 所述的样品可以采用蔬果类或液体质。在本实施例中, 所述的抗体为多克隆抗体, 所述的样品为蔬果类。

