



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101008645 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 30

(21) 申请号 200610122596. 8

(22) 申请日 2006. 09. 30

(73) 专利权人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山华南农业大学

(72) 发明人 孙远明 杨金易 潘科 王弘

吴青 雷红涛 肖治理 谌国莲  
沈玉栋

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 陈卫

(51) Int. Cl.

G01N 33/547(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 21/78(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1299592 A, 2001. 06. 20, 全文.

CN 1488942 A, 2004. 04. 14, 说明书第 3 页.

CN 1385703 A, 2002. 12. 18, 发明内容部分, 实施例 1.

Yu Y L. Bioavailability of butachlor and myclobutanil residues in soil to earthworms. 《Chemosphere》. 2005, 第 59 卷 (第 7 期), 961- 967.

杨金易. 高亲和力的农药克百威单克隆抗体的制备及鉴定. 《中国农业科学》. 2007, 第 40 卷 (第 3 期), 518-523.

桂文君. 农药残留 ELISA 速测试剂盒产业化技术研究——三唑磷、克百威 ELISA 试剂盒研制. 《中国博士学位论文全文数据库 农业科技辑》. 2007, (第 3 期), 全文.

审查员 朱镜羲

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

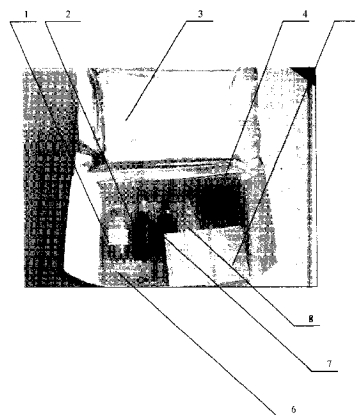
## (54) 发明名称

一种检测克百威的酶联免疫试剂盒

## (57) 摘要

本发明公开了一种检测克百威的酶联免疫试剂盒,包括盒体和酶标板,其特征在于还包括抗克百威抗体、辣根过氧化物酶标记抗原、克百威标准溶液、底物液、底物缓冲液与终止液;所述酶标板内包被有能与抗克百威抗体特异结合的第二抗体。本发明的酶联免疫试剂盒采用第二抗体预包被酶标板,节约了克百威抗体的用量,而且克服了直接包被第一抗体不利于试剂盒长期保存的问题。另外,本发明的酶联免疫试剂盒灵敏度高、准确度高、精密度好,能用于水、土壤、农产品等样品中克百威残留的检测,操作简单、快速,能同时检测大批量的样品,成本远低于传统克百威检测方法。

CN 101008645 B



1. 一种检测克百威的酶联免疫试剂盒,包括盒体和酶标板,其特征在于还包括抗克百威抗体、辣根过氧化物酶标记抗原、克百威标准溶液、底物液、底物缓冲液与终止液,所述酶标板内包被有能与抗克百威抗体特异结合的第二抗体,所述酶标板是聚苯乙烯微孔板,是采用包被液包被能与抗克百威抗体特异结合的第二抗体,并封闭微孔表面未吸附第二抗体的位点;

具体为:

(1) 缓冲液的配制:pH7.4 的 PBST 缓冲液,由  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.4g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5.8g、NaCl 16g、KCl 0.4g 和 0.05% Tween-20 1mL,加蒸馏水至 2000mL 组成;

(2) 封闭液的配制:脱脂奶粉 1.0 ~ 5.0g 溶于 100mL 蒸馏水;

(3) 底物液的配制:30%过氧化氢 30  $\mu\text{L}$  溶于 19mL 的显色液,显色液配制方法为 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液 0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  25.7mL,加上 0.1M 柠檬酸 24.3mL,加入蒸馏水 50mL 中得到,4 $^{\circ}\text{C}$  保存;

(4) 底物缓冲液的配制:邻苯二胺 OPD80mg 溶于 10mL 底物液中,4 $^{\circ}\text{C}$  保存;

(5) 微孔板的包被:第二抗体用 pH9.6,0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液,其中碳酸盐缓冲溶液含 1 ~ 2g 碳酸钠和 2 ~ 4g 碳酸氢钠以及双蒸水 1L,稀释成 0.5 ~ 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,在酶标板的每孔加 100  $\mu\text{L}$ ,4 $^{\circ}\text{C}$  下包被过夜或 37 $^{\circ}\text{C}$  包被 2h,倾去包被液,用 PBST 洗涤 3 次,拍干,然后在每孔中加入 200  $\mu\text{L}$  1.0 ~ 5.0% 脱脂奶粉,放入 37 $^{\circ}\text{C}$  温箱中 1h 后用 PBST 洗涤 3 次,拍干后干燥保存;

(6) 克百威标样溶液的配制:准确称取克百威标样 10mg,溶于 0.1L 缓冲液中,然后用缓冲液 10 倍梯度稀释分别配制 10mg/L、1mg/L、0.1mg/L、0.01mg/L、0.001mg/L 克百威溶液,另外缓冲液配制 0mg/L 对照样,4 $^{\circ}\text{C}$  保存;

(7) 抗体溶液的制备:用缓冲液适当稀释克百威抗体,4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用;

(8) 酶标抗原的制备:

利用混合酸酐法,HRP 标记半抗原 4-[ (2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并呋喃基氧)羰基]氨基]丁酸 (BFNB),具体方法为:

①称取 10mg 的 HRP 250nmol 于玻璃容器中,用 0.5mL 的去离子水溶解,加入 2  $\mu\text{L}$  双蒸的三正丁胺或 N-乙基吗啉,485  $\mu\text{L}$  的 DMF,轻轻混匀,冰浴保存;

②称取半抗原,加入 275  $\mu\text{L}$  DMF 溶解,加入 1.2 摩尔比的三正丁胺或 N-乙基吗啉,加入 1.2 摩尔比的氯甲酸异丁酯,活化 2 ~ 5min;

③将活化产物加入到 HRP 溶液中,控制半抗原与 HRP 的摩尔比为 2 : 1,冰浴反应 1h,不时摇荡一下;

④将反应物过 1cm $\times$ 45cm 的 Sephadex G25 柱,用 0.1M、pH7.0、含 0.15MNaCl 的 PBS 缓冲液洗脱,收集蛋白峰,分装冻存备用;

(9) 试剂分装:各种试剂按要求配制,测定合格后无菌分装,克百威抗体 6mL/瓶,克百威标样 1mL/瓶,酶标抗原 6mL/瓶,底物液 7mL/瓶,底物缓冲液 7mL/瓶,终止液 7mL/瓶,分装后贴标签,注明批号和有效期,4 $^{\circ}\text{C}$  保存;

(10) 试剂盒的组装:分别将可拆卸包被好第二抗体的微孔板 1 块,抗克百威抗体、酶标抗原、底物缓冲液、底物液、终止液各 1 瓶,克百威标样溶液 6 瓶,使用说明书 1 份置试剂盒内指定位置,试剂盒检验合格后封装,4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

## 一种检测克百威的酶联免疫试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测领域,具体地说,涉及一种检测克百威的酶联免疫试剂盒。

### 背景技术

[0002] 克百威(carbofuran,化学名 2,3 二氢 -2,2 二甲基 -7- 苯并呋喃基 -N- 甲基氨基甲酸酯),商品名呋喃丹,自 1969 年由 FMC 公司和 Mobay 化学公司开发生产后即作为一种高效、广谱的杀虫剂,广泛应用于粮食、蔬菜、水果及经济作物的害虫防治。克百威是一种胆碱酯酶抑制剂,对人和野生动物具有很高的毒性(小鼠经口 LD<sub>50</sub> 为 8mg/kg),是蔬菜农药残留规定中不得检出的一种,但由于杀虫效果较好,目前在粮食和蔬菜上存在不合理使用的现象比较严重,对公众健康具有较大的危害。另外,克百威在酸性土壤中不易降解,极易污染土壤和地下水源,容易造成环境污染。因此,除加强克百威的使用管理,从源头控制的同时,还应加强对其的检测与监管,防止其进入食物链中。

[0003] 目前,检测克百威残留的常规方法有气相色谱法(GC)和高效液相色谱法(HPLC),这些方法虽然灵敏精确,但需要昂贵的专业仪器,分析费时,成本较高。而酶联免疫分析(ELISA)快速检测技术因成本低、操作简单、速度快、一次检测样本量大、仪器化程度低,现已成为常用的筛选方法,但目前未见克百威免疫分析试剂盒的出现。因此,开发克百威特异、灵敏,且适于现场大批量样品快速筛选的酶联免疫分析检测试剂盒对克百威残留进行监控,保障人民群众身体健康具有重要的现实意义。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种高特异性、高灵敏度、操作方法简单快速、廉价高效,适合于检测环境和农产品中残留克百威的酶联免疫试剂盒。

[0005] 为了实现上述目的,本发明的酶联免疫试剂盒依据如下检测原理:首先将抗抗体(第二抗体)吸附于固体载体上,然后加入人工制备的抗克百威抗体,再加入酶标抗原与待测农药,酶标抗原与待测农药竞争抗克百威抗体,待测农药含量高时,则与克百威抗体结合的酶标抗原就少,反之结合在克百威抗体的酶标抗原就多,反应后加入底物进行显色加以测定,当克百威抗体量一定时,加入的待测农药量越多,与克百威抗体结合酶标抗原就越少,发色反应减弱,抑制率增高,反之,则发色反应增强,抑制率减低,因而根据已知量的农药的标准曲线和待检样品的抑制率,再根据抑制率与农药浓度之间的半对数关系作图即得标准曲线,并推算出待测农药的浓度。

[0006] 本发明合成克百威半抗原 4-[ (2,3- 二氢 -2,2- 二甲基 -7- 苯并呋喃基氧) 羰基] 氨基] 丁酸(BFNB) 和 6-[ (2,3- 二氢 -2,2- 二甲基 -7- 苯并呋喃基氧) 羰基] 氨基] 己酸(BFNH),并与载体蛋白共价偶联合成人工抗原,以人工抗原免疫兔子或小鼠,制备多克隆抗体、利用杂交瘤技术制备抗克百威的单克隆抗体或利用基因工程方法制备基因工程抗体。用辣根过氧化物酶标记半抗原。首先用抗抗体(第二抗体)预包被聚苯乙烯微孔板,

1.0 ~ 3.0%脱脂奶粉进行封闭;在酶标板中加入抗克百威抗体孵育一定时间,洗涤去除游离物,先后加入待测样品(或克百威标样)与酶标抗原,克百威、酶标抗原与结合在酶标板上的抗克百威抗体竞争性结合,洗涤去除游离物,加入酶底物,酶促反应的强度与结合在抗体上的酶标抗原量成正比,与样品(或标样)中的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。

[0007] 本发明的检测克百威的酶联免疫试剂盒,包括盒体和酶标板,包括抗克百威抗体、辣根过氧化物酶标记抗原、克百威标准溶液、底物液、底物缓冲液与终止液;所述酶标板内包被有能与抗克百威抗体特异结合的第二抗体。

[0008] 上述酶标板是96孔/40孔酶标板,是聚苯乙烯微孔板,是采用包被液包被能与抗克百威抗体特异结合的第二抗体,并封闭微孔表面未吸附第二抗体的位点。

[0009] 上述抗克百威抗体是多克隆抗体、单克隆抗体或基因工程抗体。所述多克隆抗体是以人工抗原与弗氏佐剂混合乳化后免疫兔子或小鼠制备的;所述单克隆抗体是采用杂交瘤技术制备;所述基因工程抗体是采用基因工程技术制备。

[0010] 上述辣根过氧化物酶标记抗原是将半抗原BFNH或BFNB与辣根过氧化物酶共价偶联而成。

[0011] 上述底物液为含有过氧化氢或过氧化脲的pH5.0磷酸-柠檬酸缓冲溶液;所述底物缓冲液为含有3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)或邻苯二胺(OPD)的pH5.0磷酸-柠檬酸缓冲溶液;所述终止液为1mol/L硫酸溶液。

[0012] 上述将半抗原BFNH或BFNB与辣根过氧化物酶共价偶联的方法是混合酸酐法或活性酯法。

[0013] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:1、本发明的酶联免疫试剂盒采用第二抗体预包被酶标板,节约了克百威抗体的用量,而且克服了直接包被第一抗体不利于试剂盒长期保存的问题。3、本发明的酶联免疫试剂盒采用高亲和力、高特异性的抗克百威抗体,提高了检测的灵敏度、准确度、精密度,该试剂盒对克百威线性检测范围为0.001~10mg/L,最低检测限为1ng/mL。2、本发明的酶联免疫试剂盒能用于水、土壤、农产品等样品中克百威残留的检测,操作简单、快速,能同时检测大批量的样品,成本远低于传统克百威检测方法,适用于农药克百威残留现场监控的痕量分析,具有重要现实意义。

#### 附图说明

[0014] 图1为标准曲线;

[0015] 图2为试剂盒的直观示意图。

[0016] 其中,图1中,1:酶标记抗原溶液;2:底物缓冲液;3:包被好第二抗体的微孔板;4:克百威标准溶液;5:使用说明书;6:克百威抗体溶液;7:底物液;8:终止液。

#### 具体实施方式

[0017] 实施例1 克百威酶联免疫试剂盒样品的配制

[0018] 1、缓冲液的配制缓冲液(pH7.4 PBST)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.4g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5.8g, NaCl 16g, KCl 0.4g, Tween-200.05% 1mL,加蒸馏水至2000mL。

[0019] 2、封闭液的配制 脱脂奶粉1.0~5.0g溶于100mL蒸馏水。

[0020] 3、底物液的配制 30%过氧化氢 30  $\mu$ L 溶于 19mL 的显色液 (pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液 0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  25.7mL, 0.1M 柠檬酸 24.3mL, 加蒸馏水 50mL) 中, 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0021] 4、底物缓冲液的配制邻苯二胺 OPD80mg 溶于 10mL 底物液中, 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0022] 5、微孔板的包被第二抗体用 pH9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液 (含 1~2g 碳酸钠和 2~4g 碳酸氢钠, 双蒸水 1L) 稀释成 0.5~5 $\mu$ g/mL, 在酶标板的每孔加 100 $\mu$ L, 4 $^{\circ}$ C 下包被过夜或 37 $^{\circ}$ C 包被 2h, 倾去包被液, 用 PBST 洗涤 3 次, 拍干, 然后在每孔中加入 200 $\mu$ L 1.0~5.0% 脱脂奶粉, 放入 37 $^{\circ}$ C 温箱中 1h 后用 PBST 洗涤 3 次, 拍干后干燥保存。

[0023] 6、克百威标样溶液的配制准确称取克百威标样 10mg, 溶于 0.1L 缓冲液中, 然后用缓冲液 10 倍梯度稀释分别配制 10mg/L、1mg/L、0.1mg/L、0.01mg/L、0.001mg/L 克百威溶液, 另外缓冲液配制 0mg/L 对照样, 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0024] 7、抗体溶液的制备用缓冲液适当稀释克百威抗体, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0025] 8、酶标抗原的制备:

[0026] 利用混合酸酐法, HRP 标记半抗原 4-[ (2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并呋喃基氧) 羰基] 氨基] 丁酸 (BFNB), 具体方法为:

[0027] ①称取 10mg 的 HRP (250nmol) 于玻璃容器中, 用 0.5mL 的去离子水溶解, 加入 2  $\mu$ L 双蒸的三正丁胺 (或 N-乙基吗啉), 485  $\mu$ L 的 DMF, 轻轻混匀, 冰浴保存。

[0028] ②称取一定量的半抗原, 加入 275  $\mu$ L DMF 溶解, 加入 1.2 摩尔比的三正丁胺 (或 N-乙基吗啉), 加入 1.2 摩尔比的氯甲酸异丁酯, 活化 2~5min。

[0029] ③将活化产物加入到 HRP 溶液中, 控制半抗原与 HRP 的摩尔比为 2:1, 冰浴反应 1h, 不时摇荡一下。

[0030] ④将反应物过 Sephadex G25 柱 (1cm $\times$ 45cm), 用 0.1M、pH7.0、含 0.15M NaCl 的 PBS 缓冲液洗脱, 收集蛋白峰, 分装冻存备用。

[0031] 9、试剂分装各种试剂按要求配制, 测定合格后无菌分装。克百威抗体 6mL/瓶, 克百威标样 1mL/瓶, 酶标抗原 6mL/瓶, 底物液 7mL/瓶, 底物缓冲液 7mL/瓶, 终止液 7mL/瓶。分装后贴标签, 注明批号和有效期, 4 $^{\circ}$ C 保存, 试剂盒见图 2。

[0032] 10、试剂盒的组装分别将可拆卸包被好第二抗体的微孔板 1 块, 抗克百威抗体、酶标抗原、底物缓冲液、底物液、终止液各 1 瓶, 克百威标样溶液 6 瓶, 使用说明书 1 份置试剂盒内指定位置。试剂盒检验合格后封装, 4 $^{\circ}$ C 保存。参照说明书普通人员就可使用该试剂盒用于农产品与环境中残留克百威的快速检测。

[0033] 实施例 2 检测样品的前处理:

[0034] 水样: 过滤后即可取样进行 ELISA 分析。

[0035] 土样: 取 10g 土壤用 20~40mL 甲醇提取三次, 合并提取液, 浓缩, 然后用 PBST 稀释定容至 10mL, 进行 ELISA 分析。

[0036] 蔬菜样品: 取蔬菜样品用粉碎机绞碎后称取 10g, 20~40mL 甲醇提取三次, 合并提取液, 浓缩, 用 PBST 定容至 10mL, 取样进行 ELISA 分析。

[0037] 血液: 取人体血液, 加抗凝素后直接用 ELISA 法进行分析。

[0038] 洗胃液 (2% 碳酸氢钠溶液): 取 10mL 洗胃液, 用稀 HCl 调 PH 值到中性后即可用 ELISA 法进行分析。

[0039] 呕吐物: 取样品研碎, 离心取上清用 ELISA 法进行分析。

## [0040] 实施例 3 检测方法

[0041] 试剂盒操作过程如下：取出一块包被有第二抗体的酶标板，恢复到室温后备用；加入 100uL 克百威抗体到各自孔中，37℃ 孵育 0.5h，洗板，加入 50uL 一系列浓度的克百威标样和 50uL 酶标抗原进行竞争反应，37℃ 孵育 1h，洗板，OPD37℃ 避光显色 15min，硫酸终止，酶标仪 490nm 测定结果。

[0042] 以所获样品吸光值的平均值计算抑制率，抑制率的计算公式为：

[0043]

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(A_{\max} - A_{\min}) - (A_x - A_{\min})}{A_{\max} - A_{\min}} \times 100$$

[0044] 其中， $A_{\max}$  为不加农药时的吸光值， $A_x$  为农药浓度为  $x$  时的吸光值， $A_{\min}$  为空白对照孔的吸光值。

[0045] 以抑制率为纵坐标，克百威浓度 (mg/L) 的半对数为横坐标绘制标准曲线，校正曲线在 0.001 ~ 10mg/L 范围内为线性，求出直线方程，对应样品的浓度可以根据方程求出。

## [0046] 实施例 4 保存期试验

[0047] 将试剂盒放置于 4℃，分别取 0、10、20、30、60、90、120、150 和 180d 的试剂盒，以最佳抗体、酶标抗原工作浓度为测定浓度，对克百威标准样品 (0.001mg/L) 进行检测，测定结果如表 1。

[0048] 表 1 试剂盒保存期试验结果

[0049]

时间 (d)	0	10	20	30	60	90	120	150	180
吸光度值 (OD490nm)	1.145	1.134	1.125	1.132	1.121	1.108	1.085	1.058	1.023

[0050] 从结果可看出，试剂盒在 4℃ 下至少可保存 6 个月以上。

## [0051] 实施例 5 试剂盒灵敏度测定

[0052] 利用克百威标样溶液进行反应，根据实验结果绘制标准曲线（图 1），由图 1 可得：直线方程为  $y = 11.453x + 63.267$ ，抑制率 (B/B0) 与克百威浓度的对数值在浓度 0.001 ~ 10mg/L 范围内呈显著的线性关系，相关系数为  $R^2 = 0.9891$ ，且最低检出限为 0.001mg/L。

## [0053] 实施例 6 回收率实验

[0054] 取三个浓度的克百威标样，添加到样品中，每个浓度设 6 个重复，进行测定。

[0055] 试剂盒回收率的结果如下，水为 95.20% ~ 103.14%，土壤为 90.17% ~ 107.32%，蔬菜为 95.25% ~ 101.24%，中毒样品（定性检验）为 52.48% ~ 91.04%。

## [0056] 实施例 7 准确度试验精密度实验

[0057] 取三个浓度的克百威标样，添加到样品中，每个浓度设 6 个重复，分别在 6 天进行测定。结果如下，水的变异系数均低于 5.94%，土壤的变异系数均低于 5.56%，蔬菜的变异系数均低于 4.43%，中毒样品的变异系数均低于 8.14%。

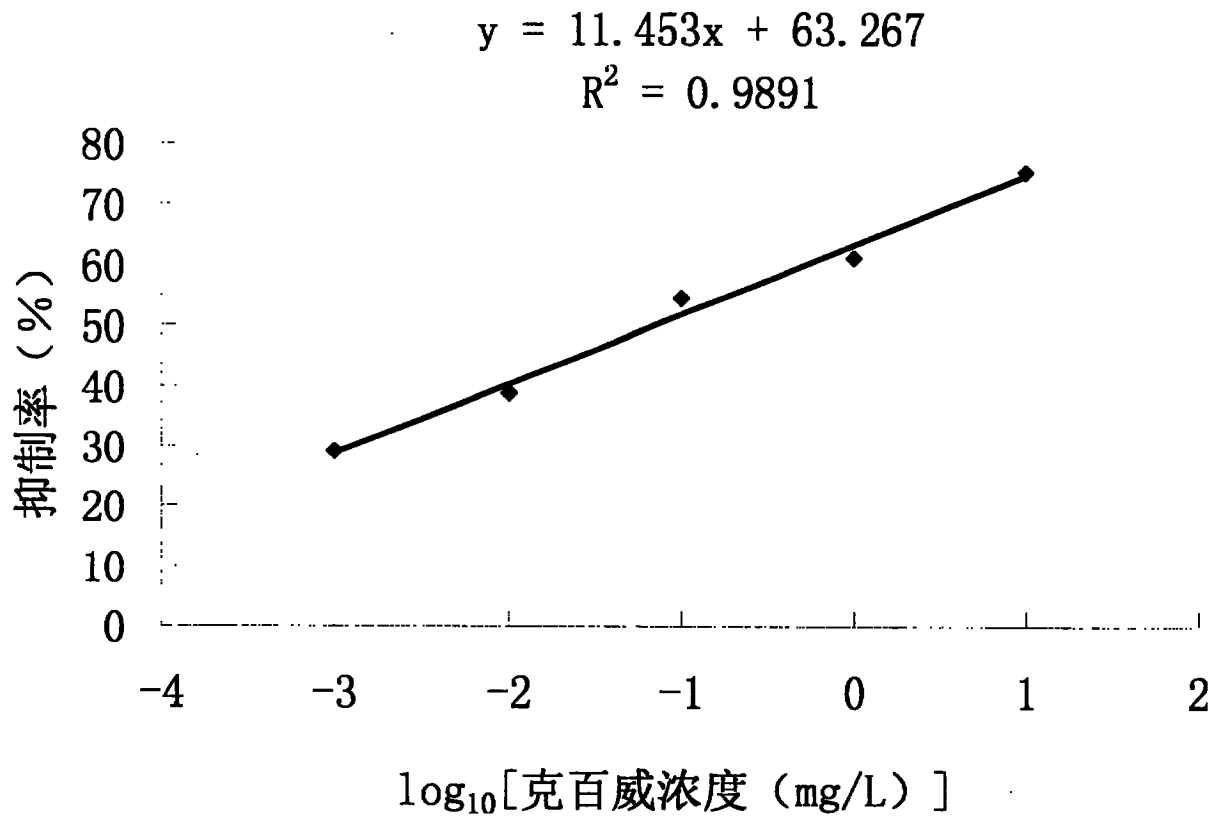


图 1

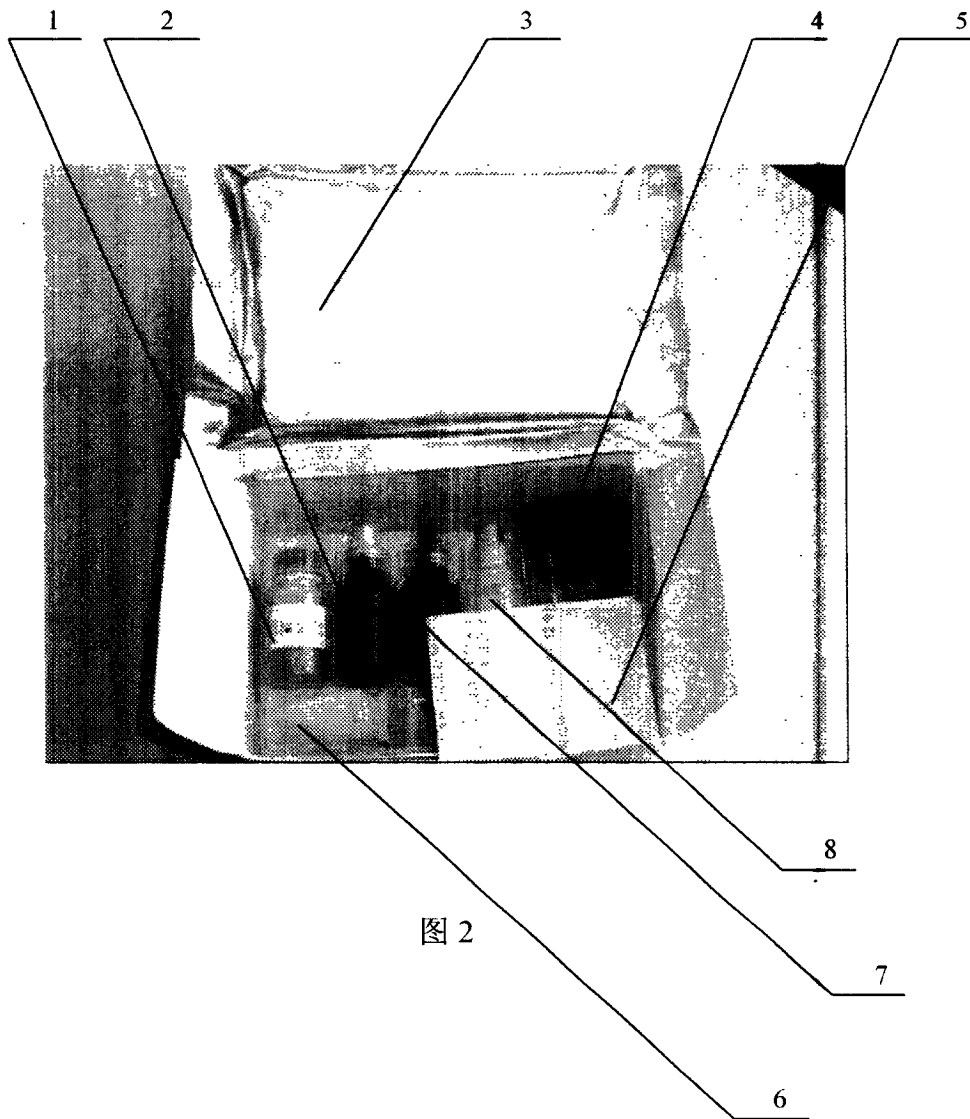


图 2

专利名称(译)	一种检测克百威的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101008645B</a>	公开(公告)日	2012-05-30
申请号	CN200610122596.8	申请日	2006-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	孙远明 杨金易 潘科 王弘 吴青 雷红涛 肖治理 谌国莲 沈玉栋		
发明人	孙远明 杨金易 潘科 王弘 吴青 雷红涛 肖治理 谌国莲 沈玉栋		
IPC分类号	G01N33/547 G01N33/577 G01N21/78 G01N33/53		
代理人(译)	陈卫		
审查员(译)	朱镜羲		
其他公开文献	CN101008645A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种检测克百威的酶联免疫试剂盒，包括盒体和酶标板，其特征在于还包括抗克百威抗体、辣根过氧化物酶标记抗原、克百威标准溶液、底物液、底物缓冲液与终止液；所述酶标板内包被有能与抗克百威抗体特异结合的第二抗体。本发明的酶联免疫试剂盒采用第二抗体预包被酶标板，节约了克百威抗体的用量，而且克服了直接包被第一抗体不利于试剂盒长期保存的问题。另外，本发明的酶联免疫试剂盒灵敏度高、准确度高、精密度好，能用于水、土壤、农产品等样品中克百威残留的检测，操作简单、快速，能同时检测大批量的样品，成本远低于传统克百威检测方法。

