[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810183488.0

[43] 公开日 2009 年 7 月 8 日

[11] 公开号 CN 101477120A

[22] 申请日 2008.12.18
[21] 申请号 200810183488.0
[71] 申请人 孙家隆
地址 266109 山东省青岛市城阳区长城路 700 号
[72] 发明人 孙家隆
权利要求书 1 页 说明书 13 页

[54] 发明名称

同时分析毒死蜱和甲基对硫磷的酶联免疫吸附测定试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种适同时用于毒死蜱和甲基对硫磷残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒，它包括盒体、设在盒体内的酶标板/试管及设在盒体内的试剂。 在酶标板的每孔内，由包被液包被能与抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体特异性合反应的通用包被抗原，并用明胶进行封闭，盒内试剂包含洗涤液、底物稀释液、毒死蜱和甲基对硫磷标准溶液、抗毒死蜱和甲基对硫磷抗体、酶标抗毒死蜱和甲基对硫磷抗体、底物、显色物质和反应终止液。 本发明能用于水、土壤、蔬菜等食品中及中毒样品中毒死蜱和甲基对硫磷残留的同时快速检测，样品的前处理过程简单，能同时检测批量的样品，样品检测成本低于传统的检测方法。

1. 一种同时使用于毒死蜱和甲基对硫磷残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒，它包括盒体、设在盒体内的酶标板和/或试管和设在盒体内的试剂，其特征在于，在酶标板的每孔内含有抗毒死蜱和甲基对硫磷通用包被抗原，盒内试剂包含抗毒死蜱和甲基对硫磷抗体、毒死蜱和甲基对硫磷标准溶液、酶标记抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体。

2.根据权利要求 1 所述的试剂盒，其中，所述抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体为通过毒死蜱和甲基对硫磷和牛血清白蛋白合成的偶联物作为免疫源注射家兔后产生的能与毒死蜱和甲基对硫磷分子、毒死蜱和甲基对硫磷通用包被原特异性结合的免疫球蛋白(IgG)。

3.根据权利要求 1 所述的试剂盒，其中，所述酶标抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体为毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体(IgG)与辣根过氧化物酶(HRP)结合形成的复合物。

4.根据权利要求 3 所述的试剂盒，其中,所述的酶标抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体是辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体和辣根过氧化物酶标记抗毒死蜱和甲基对硫磷兔共同抗体。

同时分析毒死蜱和甲基对硫磷的酶联免疫吸附测定试剂盒

（一）技术领域

本发明涉及一种同时适用于针对残留毒死蜱和甲基对硫磷进行分析的酶联免疫吸附测定试剂盒，该试剂盒主要适用于快速测定批量的水样、土壤等环境样品和中毒样品及蔬菜等食品样品中的毒死蜱和甲基对硫磷残留。属于残留农药检测领域。

（二）背景技术

农药及其代谢物传统的残留分析方法主要是依靠气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)、质谱(MS)等物理化学分析手段，但由于农药使用规模不断扩大，农药残留造成环境影响和人类健康的慢性和长期效应日益受到人们关注和担忧，对农药残留的限制也越来越严格，对分析测定对象、种类、数量、范围、指标等诸方面都提出了新的要求和更高的标准，但传统的理化分析方法通常繁琐复杂，工作量大，仪器昂贵，并要有熟练的技术人员及较长的分析周期。因此人们迫切希望有一种简单、快速、灵敏及廉价的检测技术能在野外和实验室内进行大批量的检测应用。免疫分析法正具备这些优点，所以尽管将免疫分析用于农药残留分析的时间很短，仍然很快用于环境样品和食品样品中农药残留的分析。

毒死蜱(Chlorpyrifos)，自 1965 年由美国 Dow 公司开发推广后即作为一种广谱性高效杀虫剂，在世界范围内广泛应用于粮食、棉花等经济作物的多种害虫防治，并且对地下害虫、家畜害虫以及卫生害虫也有很好的防治效果。但是由于毒死蜱对人畜的毒性相当高，近年来，因毒死蜱中毒的报道，仍然屡见不鲜。尤其是在作物和蔬菜上的大量使用，对人体健康造成极大的危害，这已引起人们的关注。甲基对硫磷（Parathion-methyl）由 1944 年德国希拉台尔（G.Schrader）化学家首先合成，1949 年拜尔公司首先建厂生产，嗣后世界各地大量有多家公司相继投产，上世纪 60 年代之后我国产、用量都很大。甲基对硫磷作为一种广谱性高效杀虫剂，在世界范围内广泛应用于粮食、棉花等经济作物的害虫防治。但是由于甲基对硫磷对人畜剧毒，因甲基对硫磷中毒的报道，屡见不鲜，目前我国虽然已经禁止生产和使用甲基对硫磷。开发一种简单快速同时适用于毒死蜱和甲基对硫磷农药残留现场监控的痕量分析方法具有重要的现实意义。

检测毒死蜱和甲基对硫磷残留量常规方法为高效液相色谱法等。然而该方法的灵敏度受样品的净化、浓缩等步骤的影响很大，且该方法需要昂贵的仪器，且过程繁琐，不适合大批量样品的检测与分析。免疫分析为毒死蜱和甲基对硫磷的残留检测提供了一个新的分析检测途径。要将免疫分析方法运用到实际中，

则需要将其制备成试剂盒。现有技术公开了多种试剂盒，其中包括了检测甲基对硫磷、毒死蜱等残留物的试剂盒及其制备方法。而现有技术中没有关于方便同时检测毒死蜱和甲基对硫磷的技术。

本发明正是针对这一空白，经过发明人长时间的实验和测试，得到了一种适用于同时针对毒死蜱和甲基对硫磷残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒。

(三)发明内容

【要解决的问题】

本发明的目的是提供一种同时检测毒死蜱和甲基对硫磷残留的酶联免疫吸附测定试剂盒。

本发明的另一目的是提供一种具有高特异性、高灵敏度，操作方法简单快速，并能用于大批量样品同时快速检测残留毒死蜱和甲基对硫磷的试剂盒。

【技术方案】

本发明涉及一种同时用于毒死蜱和甲基对硫磷残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒，它基于免疫反应和酶促反应，包括盒体、设在盒体内的酶标板和/或试管和设在盒体内的试剂，其特征在于，在酶标板的每个孔内含有抗毒死蜱和甲基对硫磷通用包被抗原，盒内试剂包含抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体、毒死蜱和甲基对硫磷标准溶液、酶标记抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体。盒内试剂还包含洗涤液、底物稀释液、底物溶液和反应终止液。

在具体的实施方案中，本发明试剂盒包括盒体、设在盒体内的 96 孔/40 孔酶标板/试管和设在盒体内的试剂。在所述酶标板的每个孔内，吸附着由包被液包被能与抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体特异性结合反应的通用包被抗原，并用 5％明胶进行封闭，盒内试剂包含洗涤液(稀释液)、底物稀释液、抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体(间接 ELISA)、毒死蜱和甲基对硫磷标准溶液、酶标毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体例如辣根过氧化物酶标记羊抗兔共同抗体(适用于间接竞争 ELISA 法)或辣根过氧化物酶标记抗毒死蜱和甲基对硫磷兔共同抗体(适用于直接竞争 ELISA 法)、底物溶液和反应终止液。

其中固相通用包被抗原的制备及盒体内试剂组成如下:

将通用包被抗原用 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，即包被液)稀释成 0.5～4ug/mL，点于 96 孔/40 孔酶标板上，100ug/孔，并用 5％明胶封闭；其中通用包被抗原为例如 N-(α-萘乙酰基)-6-氨基已酸与卵清蛋白的复合物;

洗涤液(稀释液)一瓶，40-80mL/瓶，组成比例为磷酸二氢钾 0.1-0.3g、磷酸氢二钠 2-4g、氯化钾 0.1-0.3g、吐温-20 0.5-3mL、双蒸水 500ml-1000ml，为正常

使用的 15-30 倍浓缩液;

底物稀释液一瓶，30-50mL/瓶，配制如下：柠檬酸 3-6g，磷酸氢二钠 1-3g，双蒸水，为正常使用的 5-10 倍浓缩液;

酶底物为 30％过氧化氢，10-15mL/瓶和邻苯二胺固体粉末 4-6 支，10-20mg/支;

抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体(IgG)4 瓶，100ml/瓶，工作浓度为 1:500-1000(间接 ELISA 法); 所述的抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体(IgG)为通过毒死蜱和甲基对硫磷和牛血清白蛋白合成的偶联物作为免疫源注射家兔后产生的能与毒死蜱和甲基对硫磷分子、毒死蜱和甲基对硫磷包被原特异性结合的免疫球蛋白(IgG);

辣根过氧化物酶标记抗毒死蜱和甲基对硫磷兔共同抗体(直接 ELISA 法)或者辣根过氧化物酶标记羊抗兔共同抗体(间接 ELISA 法)一瓶，200-400uL/瓶，为正常使用时 800-1500 倍浓缩液; 上述辣根过氧化物酶标抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体为毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体(IgG)与辣根过氧化物酶(HRP)结合形成的复合物;

反应终止液一瓶，30-50ml/瓶，为 2mol/L 硫酸;

毒死蜱和甲基对硫磷不同浓度系列(0.1、0.5、2、10、50、100mg/L)标准液 6 瓶，1-4mL/瓶，甲醇定容，使用时用 PBST 稀释 10 倍。

本发明的同时适用于毒死蜱和甲基对硫磷残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒，能够同时检测水样、土壤、中毒样品、蔬菜等食品中毒死蜱和甲基对硫磷的残留。试剂盒测定原理首先将农药分子与大分子载体(如蛋白质)偶联制得的复合物作为通用包被抗原吸附于固相载体上，然后加入待测农药和抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体(间接 ELISA 法)或酶标抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体(直接 ELISA 法)。通用包被抗原、待测农药与抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体(或酶标抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体)进行竞争反应，待测农药含量多，则被结合在通用包被抗原上的共同抗体少，最终酶促反应显色浅，反之结合在通用包被抗原的共同抗体(或酶标共同抗体)多，最终酶促反应显色深。上述通用包被抗原、待测农药、抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体或酶标抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体竞争结合反应后，再加入底物溶液出现显色反应加以测定(间接 ELISA 法，加底物溶液前不需再加入酶标 2 抗)。当共同抗体或酶标共同抗体量一定时，样品中的待测农药量越多，与通用包被抗原结合的酶标共同抗体就越少，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，因而根据已知量农药的标准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。

抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体的制备

将人工合成的毒死蜱和甲基对硫磷免疫原(即毒死蜱和甲基对硫磷半抗原与牛血清白蛋白结合形成的偶联物)多次注射家兔刺激其体的免疫系统产生能对毒死蜱和甲基对硫磷农药分子或毒死蜱和甲基对硫磷包被原(毒死蜱和甲基对硫磷半抗原与卵清蛋白人工合成的偶联物)特异性识别结合的免疫球蛋白(IgG)。

一、免疫原的选择和制备

1、选择毒死蜱和甲基对硫磷半抗原与载体蛋白结合比在 40-50 的偶联物作免疫原。

2、弗氏佐剂的制备：石蜡油与羊毛脂 3：1 混匀湿热高压灭菌得弗氏不完全佐剂。在弗氏不完全佐剂中按规 2mg/ml 加卡介苗冻干粉混匀得弗氏完全佐剂。

3、佐剂免疫原的制备：将免疫原溶液慢慢解冻，用生理盐水稀释至 3mg/ml(以载体蛋白计)按免疫剂量吸入适当容积于注射器中，且免疫原与佐剂以 1：1(V/V)混合，后以用无菌橡胶管相连的两支 5ml 灭菌玻璃注射器(总体积不超过 4ml)交替推动，使佐剂与免疫原溶液充分混合乳化，形成油包水乳液，直至滴入冰水中暂不扩散为止。

二、免疫方案

选用健康纯白新西兰雄兔(体重约 1.5kg 左右)作为免疫动物。注射前耳静脉采血制备少时对照血清(1-2ml)，低温贮藏备用。然后将上述已制备好的佐剂免疫原用背部皮内多点注射法注射，以 20-25 点左右小剂量注射入兔体内，总共注射 7 次，时间间隔第一次与第二次为 4 个周，其后每次的时间间隔为 2 周。四免后 7-10 天，耳缘静脉采血制备少量抗血清，以阴性血清作对照，用琼脂双扩散法和间接 ELISA 法检测血清效价。待琼扩散效价达 1：16 以上，以间接 ELISA 法测定抗血清终点效价达大于 10 万，中点效价大于 2 万。颈动脉全采血(无菌)制备抗血清于-20℃冻存。

三、共同抗体的纯化

1、硫酸铵盐法：(1)50ml 烧杯中，X 毫升血清+Xml 生理盐水，置于电磁搅拌器上。(2)缓慢滴入 2X 毫升饱和硫酸铵(PH7.0)，使达到 50％的饱和度。控制搅拌速度不出气泡。滴加完毕，继续搅拌 5 分钟。(3)室温放置 30 分钟。(4)离心 3000 转/分×20 分钟。(5)弃去上清液，沉淀物溶于 2X 毫升生理盐水，逐滴加饱和硫酸铵 Xml 使达 33％饱和度。(6)室温放置 30 分钟。(7)弃去上清液，将沉淀物溶于 2 毫升生理盐水，装透析袋，置 4℃冰箱 0.01M PH7.0 PB 缓冲液透析，换液数次，每次换液时用纳氏试剂检查 NH^+；至不出现黄色沉淀为止。

2、DEAE 纤维素柱层析法：(1)DEAE 预处理(2)装柱、加样和洗脱(3)合并、浓缩、测蛋白。

3、免疫球蛋白(IgG)浓度的测定：将纯化后的共同抗体溶液用生理盐水稀释适当倍数后测 OD_{280}，按下式计算兔 IgG 含量

$$IgG\% = \frac{OD_{280}}{13.5} \times 稀释倍数$$

4、共同抗体的纯度鉴定：快速染色聚丙烯酰胺凝胶电泳法，分离胶浓度为6.5％。

酶标共同抗体的制备(采用改良过碘酸钠法)

具体操作如下：称 5-10mgHRP 溶解于 lml 蒸馏水中，于上液中加入 0.2-0.4mL 新配的 0.1mol/LNalO4 溶液，室温下避光搅拌 15-30 分钟。将上述溶液装入透析袋中，用 lmmol/LpH4.4 的醋酸盐缓冲液透析，4℃过夜。加 20-40uL0.2mol/LpH9.5 碳酸盐缓冲液，使以上醛化 HRP 的 pH 升高到 9.0-9.5，然后立即加入 1-2ml 含有 10-20mg 纯化共同抗体的 0.0lmol/L 碳酸盐缓冲液，室温避光轻轻搅拌 2～3 小时。加 0.14).2mL 新配的 4mg/mLNaBH4 液，混匀，再置 4℃2-3 小时。将反应液装入透析袋中，用 0.15mol/LpH7.4PBS 透析，4℃过夜。在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵溶液，置 4℃1～2 小时。3000rpm 离心半小时，弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵溶液洗二次，最后沉淀物溶于少量 0.15mol/LpH7.4℃的 PBS 中。将上述溶液装入透析袋中，对 0.15mol/LpH7.4 的 PBS 缓冲盐水透析，去除铵离子后(用萘氏试剂检测)，10,000-12,000rpm 离心 30 分钟，上清液即为酶结合物，用等量甘油分装后，分别于-4℃、-20℃保存。经直接 ELISA 法(E-Ab 法)测定，效价为 64000。

毒死蜱和甲基对硫磷通用人工抗原(和通用包被原)合成与鉴定

分别称取毒死蜱和甲基对硫磷人工半抗原各 60mg、72 mg 共同溶于 6ml 无水 DMF，开启搅拌，加入 160uL 三正丁胺，冰浴下缓慢滴加同 2ml 无水 DMF 溶解的氯甲酸异酯 80uL，加毕，4℃搅拌反应 1 小时，然后于室温反应 1.5 小时。

称取 BSA、OVA 各 100mg，分别溶于 8m10.05mol/L、pH8.7 的硼酸盐缓冲液，将上述反应液分为二等分，分别用滴管缓慢滴加到不同蛋白质溶液中，每种蛋白质溶液中加一份，保持反温度 15℃左右。加毕，室温搅拌反应 12 小时。

将反应液置透析袋中，于 4℃下对 0.0lmol/L、pH7.4PB 透析，每 6 小时换一次缓冲液，直至透析液中测不出毒死蜱和甲基对硫磷人工半抗原的紫外吸收为止。精确计量透析袋内偶联物溶液的体积。

将所得偶联物溶液稀释适当倍数，使其 OD_{293} 约为 0.4-0.8。配制毒死蜱和甲基对硫磷人工半抗原溶液使其浓度为 20ug/ml 左右。另配制相应载体蛋白溶液使其浓度为 0.5mg/ml。分别对毒死蜱和甲基对硫磷人工半抗原溶液、载体蛋白溶液和偶联物溶液进行紫外线吸收光谱扫描，扫描波长范围 240-320nm，根据扫描图谱定性确定半抗原是否与载体蛋白发生了偶联。然后根据 OD_{292}，分别计算各自的摩尔吸光数 ε_{292}。按下式计算毒死蜱和甲基对硫磷人工半抗原与载体蛋白的结合比。

$$\text{结合比} = \frac{\varepsilon292\text{（偶联物）}-\varepsilon292\text{（载体蛋白）}}{\varepsilon292\text{（CBRH）}}$$

毒死蜱人工半抗原的合成

称取 0.32mol$PSCl_3$ 于 100ml 三口瓶中，在 15～20℃滴加 1.2mol 无水 CH_3OH，并于该温度下继续反应 1 小时，用 15ml 水洗涤反应液 2 次，得黄色油状物。取该产物 1.8g 用 6mlTHF 于 50ml 三口瓶中溶解，滴加 6ml 溶解有 1g3,5,6-三氯吡啶和 0.8ml 三乙胺的 THF 溶液，加毕继续反应 2 小时，过滤、浓缩，用正己烷/二氯甲烷＝20：1 的淋洗液柱色谱分离，得黄色油状物 a。取 6-氨基己酸 1.3g 加入 50ml 三口瓶中，用 2.5mol/L 的氢氧化钠溶液溶解，在 0～10℃滴加产物 a2g，于 0℃左右滴加 2.5mol/L 的氢氧化钠溶液 4ml，之后在 5～15℃搅拌反应 4.5 小时，加入适量蒸馏水调节 pH～10，用石油醚/乙醚＝7：1 的有机溶剂洗涤，水层用盐酸调节 pH＝2.0，得白色絮状物，用乙醚提取，乙醚提取液 Na_2CO_3 干燥并脱溶，得浅黄色粘稠液体即为毒死蜱人工半抗原。

H'-NMR δ (ppm)(TMS、$CDCl_3$): 1.40（t,3H,-CH_3），1.56（m,2H,-CH_2-），1.63（m,4H,2-CH_2-），2.38（t,2H,-CH_2COO-），3.16（m,2H,-CH_2N-），3.46（m,1H,-NH-），4.33（q+q,2H,-CH_2O-），7.85（s,1H,Ar-H）。

甲基对硫磷人工半抗原的合成

54 克 $PSCl_3$（0.32mol）于 100ml 三口瓶中，15～20℃滴加重蒸无水 CH_3OH，此条件下继续反应 1 小时。用水洗涤反应液，得黄色油状产物 a～45 克。

250ml 三口瓶中加入乙醚 100ml、a0.24mol、0.22mol 对硝基苯酚，20℃以下加入三正丁胺 3ml，此条件下滴加 20％NaOH（0.24mol），继续反应 1 小时，乙醚层 3％NaON 洗涤 3*20ml，再用蒸馏水洗涤，$MgSO_4$ 干燥，减压蒸除乙醚。石油醚/乙醚（～7：1）柱分离，得产物 b～40 克。

b 溶于乙醚，0～10℃滴加入 6－氨基己酸（c）的 NaON 溶液（6－氨基己酸溶于 2.5MNaOH），（反应物比例 c：b～1：0.75）。此条件下滴加缚酸剂 2.5MNaOH，然后与 5～15℃反应 4.5 小时，反应液为中性，产物亮黄色。加入

适量水，之后用 2.5MNaOH 调整 PH = 10 左右，反应液透明。水层用石油醚洗涤后用 2.5MHCl 调整 PH = 2 左右，用乙醚提取，减压蒸馏除去乙醚。纯化石油醚/乙醚（ ~ 7: 3）柱分离。NMR 鉴定结构。

H'-NMR δ (ppm)(TMS、$CDCl_3$): 1.12~1.88（m,8H,-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-），2.24~2.50(t,2H,-CH_2CO-),2.88~3.18(m,2H,-CH_2N-),3.62~3.88(d,3H,-CH_3),7.24~8.26(m,4H,Ar-H)。

包被酶标板的制备

通用包被抗原用 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 0.5-4ug/ml，在酶标板的每孔加 100uL，4℃下包被过夜或 37℃包被 2h，倾去包被液，用 PBST 洗涤 3 次，拍干，然后在每孔中加入 150uL5％明胶，放入 37℃温箱中 0.4-1 小时后用 PBST 洗涤 3 次，拍干后干燥保存。

检测样品的前处理

水样：过滤后即可取样进行 ELISA 分析。

土样：取 10g 土壤用 20-40mL 丙酮提取三次，合并提取液，浓缩，然后用 PBST 稀释定容至 10mL，进行 ELISA 分析。

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

血液：取人体血液，加抗凝素后直接用 ELISA 法进行分析。

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。

呕吐物：取样品研碎，离心取上清用 ELISA 法进行分析。

试剂盒操作过程

1）直接竞争 ELISA 法：取出一块包被有毒死蜱和甲基对硫磷通用包被抗原酶标板，恢复到室温后备用；加入 50uL 标样或处理好的样品到各自孔中，标样和样品做 2-4 个重复；加入 50uL 稀释的酶标共同抗体，37℃孵育 1-2 小时；倒出孔中的液体，将微板倒置在吸水纸上拍打，以保证完全除去孔中的液体，用 200uL 稀释好的 PBST 洗 2-6 次，拍干；然后每孔加入 100uL 底物液，轻微振匀，并在 37℃暗处孵育 15-25 分钟进行显色反应；加入 50uL 反应终止液，混合好后，测定 OD_{450nm} 值或者 OD_{490nm} 值。

2）间接竞争 ELISA 法：取出一块包被有毒死蜱和甲基对硫磷通用包被抗原酶标板，恢复到室温后备用；加入 50uL 标样或处理好的样品到各自孔中，标样和样品做 2-4 个重复；加入 50uL 稀释的共同抗体，37℃孵育 1-2 小时：倒出孔

中的液体，将微孔板倒置在吸水纸上拍打，以保证完全除去孔中的液体，用 200uL 稀释好的 PBST 洗 2-6 次；加入 100uL 稀释好酶标二抗，37℃孵育 1-2 小时；倒出孔中的液体，将微孔板倒置在吸水纸上拍打，以保证完全除去孔中的液体，用 200uL 稀释好的 PBST 洗 2-6 次；然后每孔加入 100uL 底物液与显色物质的混和液，轻微振匀，并在 37℃暗处孵育 15-25 分钟进行显色反应；加入.50uL 反应终止液，混合好后，测定 OD_{450nm} 值或者 OD_{490nm} 值。

以所获得的标样和样品吸光值的平均值计算各孔的吸光值的抑制率

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(ODmax-ODmin)-(ODx-ODmin)}{(ODmax-ODmin)} \times 100\%$$

OD_{max} 为不加药时的吸光值，OD_x 为农药 X 时的吸光值，OD_{min} 为空白对照孔的吸光值。

计算的标样值绘成一个对应毒死蜱和甲基对硫磷浓度(mS 几)的半对数坐标系统曲线图，直接竞争 ELISA 法的校正曲线在 0.01 ~ 10mg/L 范围内为线性；间接竞争 ELISA 法的校正曲线在 0.005-10mg/L,范围内为线性，对应样品浓度可从校正曲线读出，也可根据标样的浓度与抑制率求出线性方程，然后求出对应样品的浓度。

【有益效果】

本发明的优点是能同时用于水样、土壤、中毒样品、蔬菜等食品中毒死蜱和甲基对硫磷残留的检测，样品的前处理过程简单，能同时检测批量的样品，样品检测成本远低于传统的检测方法。试剂盒采用强特异性、高效价的共同抗体，提高检测的灵敏度、准确度、精密度。试剂盒的保存期超过 12 个月。本发明简单快速，适用于农药残留现场监控的痕量分析方法，具有重要的现实意义。

(五)具体实施方式

在下面实施例中更详细地描述本发明，并非对本发明的限制，其中比例和百分比在没有特别说明的情况下均为重量/重量比。

实施例 1

本发明试剂盒产品包括盒体、盒体内的 96 孔/40 孔酶标板和检测试剂。

试剂盒中采用毒死蜱和甲基对硫磷人工半抗原与卵清蛋白的复合物作为通用包被抗原，将其用 pH 为 9.6 的 0.05mol/L 碳酸盐缓冲溶液(含 1g 碳酸钠和 4g 碳酸氢钠，双蒸水 1L)稀释成 4ug/mL，点于 96 孔/40 孔酶标板上，100ug/孔，并用 5％明胶封闭。

盒内试剂包含：洗涤液(稀释液)、底物稀释液、抗毒死蜱和甲基对硫磷共同

抗体(间接 ELISA)、毒死蜱和甲基对硫磷标准溶液、辣根过氧化物酶标记羊抗兔共同抗体(适用于间接竞争 ELISA 法)、辣根过氧化物酶标记抗毒死蜱和甲基对硫磷兔共同抗体(适用于直接竞争 ELISA 法)、底物溶液和反应终止液。配制方法如下:

洗涤液(稀释液)40mL，组成比例为磷酸二氢钾 0.1g、磷酸氢二钠 4g、氯化钾 0.1g、吐温-20 3mL、双蒸水 1000ml，为正常使用的 15-30 倍浓缩液;

底物稀释液 50mL，配制如下: 柠檬酸 3g，磷酸氢二钠 1g，双蒸水，为正常使用的 5～10 倍浓缩液;

酶底物为 30％过氧化氢，15mL 和邻苯二胺固体粉末 40mg;

毒死蜱和甲基对硫磷和牛血清白蛋白合成的偶联物作为免疫源注射家兔后产生的能与毒死蜱和甲基对硫磷分子、毒死蜱和甲基对硫磷通用包被原特异性结合的免疫球蛋白(IgG)，抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体(IgG)400ml，工作浓度为 1: 1000(间接 ELISA 法);

辣根过氧化物酶标记抗毒死蜱和甲基对硫磷兔共同抗体(直接 ELISA 法)或者辣根过氧化物酶标记羊抗兔共同抗体(间接 ELISA 法)200uL，为正常使用时 800-1500 倍浓缩液; 上述辣根过氧化物酶标抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体为毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体(IgG)与辣根过氧化物酶(HRP)结合形成的复合物;

反应终止液为 2mol/L 的硫酸 30mL;

毒死蜱和甲基对硫磷不同浓度系列(0.1、0.5、2、10、50、100mg/L)标准液 6 瓶，1-4mL/瓶，甲醇定容，使用时用 PBST 稀释 10 倍。

实施例 2

本发明试剂盒产品包括盒体、盒体内的 96 孔/40 孔酶标板和检测试剂。

试刑盆甲米用毒死蜱和甲基对硫磷人工半抗与卵清蛋白的复合物作为通用包被抗原(CBRH-OVA)，将其用 pH 为 9.6 的 0.05mol/L 碳酸盐缓冲溶液(含 2g 碳酸钠和 2g 碳酸氢钠，双蒸水 1L)稀释成 0.5ug/mL，点于 96 孔/40 孔酶标板上，100ug/孔，并用 5％明胶封闭。

盒内试剂包含: 洗涤液(稀释液)、底物稀释液、抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体(间接 ELISA)、毒死蜱和甲基对硫磷标准溶液、辣根过氧化物酶标记羊抗兔共同抗体(适用于间接竞争 ELISA 法)、辣根过氧化物酶标记抗毒死蜱和甲基对硫磷兔共同抗体(适用于直接竞争 ELISA 法)、底物溶液和反应终止液。配制方法如下:

洗涤液(稀释液)80mL，组成比例为磷酸二氢钾 0.3g、磷酸氢二钠 2g、氯化钾 0.3g、吐温-20 0.5mL、双蒸水 500ml，为正常使用的 15-30 倍浓缩液;

底物稀释液 30mL，配制如下：柠檬酸 6g，磷酸氢二钠 1g，双蒸水，为正常使用的 5-10 倍浓缩液；

酶底物为 30％过氧化氢，10mL 和邻苯二胺固体粉末 120mg；

毒死蜱和甲基对硫磷和牛血清白蛋白合成的偶联物作为免疫源注射家兔后产生的能与毒死蜱和甲基对硫磷分子、毒死蜱和甲基对硫磷通用包被原特异性结合的免疫球蛋白(IgG)，抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体(IgG)400ml，工作浓度为 1：500(间接 ELISA 法)；

辣根过氧化物酶标记抗毒死蜱和甲基对硫磷兔共同抗体(直接 ELISA 法)或者辣根过氧化物酶标记羊抗兔共同抗体(间接 ELISA 法)400uL，为正常使用时 800-1500 倍浓缩液；上述辣根过氧化物酶标抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体为毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体(IgG)与辣根过氧化物酶(HRP)结合形成的复合物；

反应终止液为 2mol/L 的硫酸 50mL；

毒死蜱和甲基对硫磷不同浓度系列(0.1、0.5、2、10、50、100mg/L)标准液 6 瓶，1-4mL/瓶，甲醇定容，使用时用 PBST 稀释 10 倍。

实施例 3

本发明试剂盒产品包括盒体、盒体内的 96 孔/40 孔酶标板和检测试剂。

试剂盒中采用毒死蜱和甲基对硫磷人工半抗与卵清蛋白的复合物作为通用包被抗原(CBRH-OVA)，将其用 pH 为 9.6 的 0.05mol/L 碳酸盐缓冲溶液(含 2g 碳酸钠和 2g 碳酸氢钠，双蒸水 1L)稀释成 0.5ug/ml，点于 96 孔/40 孔酶标板上，100ug/孔，并用 5％明胶封闭。

盒内试剂包含：洗涤液(稀释液)、底物稀释液、抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体(间接 ELISA)、毒死蜱和甲基对硫磷标准溶液、辣根过氧化物酶标记羊抗兔共同抗体(适用于间接竞争 ELISA 法)、辣根过氧化物酶标记抗毒死蜱和甲基对硫磷兔共同抗体(适用于直接竞争 ELISA 法)、底物溶液和反应终止液。配制方法如下：

洗涤液(稀释液)60mL，组成比例为磷酸二氢钾 0.2g、磷酸氢二钠 3g、氯化钾 0.2g、吐温-20 1.5mL、双蒸水 750ml，为正常使用的 15-30 倍浓缩液；

底物稀释液 45mL，配制如下：柠檬酸 4g，磷酸氢二钠 2g，双蒸水，为正常使用的 5～10 倍浓缩液；

酶底物为 30％过氧化氢，12mL 和邻苯二胺固体粉末 90mg；

毒死蜱和甲基对硫磷和牛血清白蛋白合成的偶联物作为免疫源注射家兔后产生的能与毒死蜱和甲基对硫磷分子、毒死蜱和甲基对硫磷包被原特异性结合的免疫球蛋白(IgG)，抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体(IgG)400ml，工作浓度为 1：

750(间接 ELISA 法);

辣根过氧化物酶标记抗毒死蜱和甲基对硫磷兔共同抗体(直接 ELISA 法)或者辣根过氧化物酶标记羊抗兔共同抗体(间接 ELISA 法)300uL，为正常使用时800-1500 倍浓缩液；上述辣根过氧化物酶标抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体为毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体(IgG)与辣根过氧化物酶(HRP)结合形成的复合物;

反应终止液为 2mol/L 的硫酸 40mL;

毒死蜱和甲基对硫磷不同浓度系列(0.1、0.5、2、10、50、100mg/L)标准液 6 瓶，1-4mL/瓶，甲醇定容，使用时用 PBST 稀释 10 倍。

实施例 4

本发明试剂盒产品包括盒体、盒体内的 96 孔/40 孔酶标板和检测试剂。

试剂盒中采用毒死蜱和甲基对硫磷人工半抗与卵清蛋白的复合物作为通用包被抗原，将其用 pH 为 9.6 的 0.05mol/L 碳酸盐缓冲溶液(含 2g 碳酸钠和 2g 碳酸氢钠，双蒸水 1L)稀释成 0.5ug/mL，点于 96 孔/40: -L 酶标板上，100ug/孔，并用 5％明胶封闭。

盒内试剂包含：洗涤液(稀释液)、底物稀释液、抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体(间接 ELISA)、毒死蜱和甲基对硫磷标准溶液、辣根过氧化物酶标记羊抗兔共同抗体(适用于间接竞争 ELISA 法)、辣根过氧化物酶标记抗毒死蜱和甲基对硫磷兔共同抗体(适用于直接竞争 ELISA 法)、底物溶液和反应终止液。配制方法如下:

洗涤液(稀释液)70mL，组成比例为磷酸二氢钾 0.1g、磷酸氢二钠 4g、氯化钾 0.15g、吐温-20 5.5mL、双蒸水 1000ml，为正常使用的 15-30 倍浓缩液;

底物稀释液 45mL，配制如下：柠檬酸 3g，磷酸氢二钠 2.5g，双蒸水，为正常使用的 5-10 倍浓缩液;

酶底物为 30％过氧化氢，14mL 和邻苯二胺固体粉末 120mg;

毒死蜱和甲基对硫磷和牛血清白蛋白合成的偶联物作为免疫源注射家兔后产生的能与毒死蜱和甲基对硫磷分子、毒死蜱和甲基对硫磷通用包被原特异性结合的免疫球蛋白(IgG)，抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体 (IgG)400ml，工作浓度为 1: 700(间接 ELISA 法);

辣根过氧化物酶标记抗毒死蜱和甲基对硫磷兔共同抗体(直接 ELISA 法)或者辣根过氧化物酶标记羊抗兔共同抗体(间接 ELISA 法)200uL，为正常使用时800-1500 倍浓缩液；上述辣根过氧化物酶标抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体为毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体(IgG)与辣根过氧化物酶(HRP)结合形成的复合物;

反应终止液为 2mol/L 的硫酸 350mL;

毒死蜱和甲基对硫磷不同浓度系列(0.1、0.5、2、10、50、100mg/L)标准液6瓶，1-4mL/瓶，甲醇定容，使用时用PBST稀释10倍。

对本发明产品进行如下测试

1、保存期试验

将试验剂盒放置于4℃和-20℃保存，分别取0，20，40，60，120，180，240，300和360d的试剂盒，以最佳共同抗体抗原工作浓度为测定浓度，进行标准样品检测以测定其检测效果。保存期测定结果如下表:

表1.直接竞争ELISA法试剂盒保存期试验结果

时间(d)	0	20	40	60	120	180	240	300	360
OD_{450}（4℃）	1.070	1.068	1.067	1.065	1.064	1.063	1.063	1.061	1.059
OD_{450}（20℃）	1.071	1.066	1.065	1.064	1.064	1.062	1.062	1.061	1.060

表2.间接竞争EIISA法试剂盒保存期试验结果

时间(d)	0	20	40	60	120	180	240	300	360
OD_{450}（4℃）	1.118	1.118	1.115	1.115	1.113	1.109	1.113	1.113	1.012
OD_{450}（20℃）	1.124	1.124	1.119	1.117	1.114	1.113	1.111	1.108	1.104

以上结果可以看出，试剂盒在4℃下至少可保存12个月以上。

2、试剂盒灵敏度测定

将毒死蜱和甲基对硫磷标准溶液稀释成系列浓度，用直接ELISA法分析分别得到以下曲线方程为：y=4.965+16.556x，毒死蜱和甲基对硫磷在0.0lmg/L-10mg/L范围内，Logit(B/Bo)与毒死蜱和甲基对硫磷深度的对数值呈显著的线性关系，相关系数为r^2=0.9471，检出限为0.0lmg/L。用间接ELISA法分析分别得到曲线方程为：y=63.654+9.938x，毒死蜱和甲基对硫磷在0.005mg/L-10mg/L范围内，Logit(B/BO)与毒死蜱和甲基对硫磷浓度的对数值呈著的线性关系，相关系数为r^2=0.9885，检出限为0.005mg/L。

3、准确度试验精密度试验

取三个浓度的毒死蜱和甲基对硫磷标样，添加到样品中，每个浓度设6个重复，进行测定。试剂盒回收率的结果如下，水为95.8%-105.5%，蔬菜为100.8%-107.5%。水样的变异系数均低于5.5%，蔬菜的变异系数均低于11.5%。

4、试剂盒特异性试验

选择毒死蜱和甲基对硫磷的类似物如克百威、灭多威、α-萘酚、乙基对硫磷，反应步骤同试剂盒操作，得到各种农药抑制中浓度。再用下式计算农药对毒死蜱和甲基对硫磷的交叉反应性。交叉反应率愈小，反应的特异性愈强。交叉反应率愈大，交叉反应率可按下式计算，

$$\text{交叉反应率(\%)} = \frac{\text{抑制率为50\%甲萘威的浓度}}{\text{抑制率为50\%其他农药的浓度}} \times 100\%$$

本试验测定结果见表 3。从表 3 可以知道，间接 ELISA 法抑制率达 50% 时，毒死蜱和甲基对硫磷所需浓度为 30ug/L，其它几种有机磷类农药所需浓度为 120-1000ug/L。说明该试剂盒的特异性好，可保证对样品中毒死蜱和甲基对硫磷残留测定结果的可靠性。

专利名称(译)	同时分析毒死蜱和甲基对硫磷的酶联免疫吸附测定试剂盒		
公开(公告)号	CN101477120A	公开(公告)日	2009-07-08
申请号	CN200810183488.0	申请日	2008-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	孙家隆		
申请(专利权)人(译)	孙家隆		
当前申请(专利权)人(译)	孙家隆		
[标]发明人	孙家隆		
发明人	孙家隆		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种适同时用于毒死蜱和甲基对硫磷残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒，它包括盒体、设在盒体内的酶标板/试管及设在盒体内的试剂。在酶标板的每孔内，由包被液包被能与抗毒死蜱和甲基对硫磷共同抗体特异性合反应的通用包被抗原，并用明胶进行封闭，盒内试剂包含洗涤液、底物稀释液、毒死蜱和甲基对硫磷标准溶液、抗毒死蜱和甲基对硫磷抗体、酶标抗毒死蜱和甲基对硫磷抗体、底物、显色物质和反应终止液。本发明能用于水、土壤、蔬菜等食品中及中毒样品中毒死蜱和甲基对硫磷残留的同时快速检测，样品的前处理过程简单，能同时检测批量的样品，样品检测成本低于传统的检测方法。

$$IgG\% = \frac{OD_{280}}{13.5} \times 稀释倍数$$