

[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 33/573

G01N 33/558



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03156784.3

[43] 公开日 2004 年 8 月 25 日

[11] 公开号 CN 1523356A

[22] 申请日 2003.9.12 [21] 申请号 03156784.3

[71] 申请人 中国农业科学院蔬菜花卉研究所

地址 100081 北京市海淀区中关村大街 12 号

[72] 发明人 张友军 孙家隆 王升吉 尚佑芬

赵玖华 杨崇良 祁 凯 徐宝云

吴青君 路兴波 孙红炜

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

代理人 向 华

权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 1 页

[54] 发明名称 分析残留甲萘威的酶联免疫吸附测定试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种适用于甲萘威残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒，它包括箱体、设在箱体内的酶标板/试管及设在箱体内的试剂。在酶标板的每孔内，由包被液包被能与抗甲萘威抗体特异性反应的包被抗原，并用明胶进行封闭，盒内试剂包含洗涤液、底物稀释液、甲萘威标准溶液、抗甲萘威抗体、酶标抗甲萘威抗体、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甲萘威残留的快速检测，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。

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

1. 一种适用于甲萘威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，在酶标板的每个孔内含有抗甲萘威包被抗原，盒内试剂包含抗甲萘威抗体、甲萘威标准溶液、酶标记抗甲萘威抗体。

2. 根据权利要求1的试剂盒，其中，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。

3. 根据权利要求1或2的试剂盒，所述的包被抗原由包被液包被，并用明胶进行封闭；其中，

所述的包被抗原为N-(α -萘乙酰基)-6-氨基己酸与卵清蛋白的复合物；

所述作为包被液的碳酸盐缓冲溶液组成比例为：1~2g碳酸钠和2~4g碳酸氢钠，双蒸水1L，PH=9.6。

4. 根据权利要求1-3之一所述的试剂盒，其中，所述抗甲萘威抗体为通过甲萘威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甲萘威分子、甲萘威包被原特异性结合的免疫球蛋白(IgG)。

5. 根据权利要求1-4之一所述的试剂盒，其中，所述酶标抗甲萘威抗体为甲萘威抗体(IgG)与辣根过氧化物酶(HRP)结合形成的复合物。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒，其中，所述的酶标抗甲萘威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甲萘威兔抗体。

7. 根据权利要求1-6之一所述的试剂盒，其中，所说的洗涤液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。

8. 根据权利要求1-7之一所述的试剂盒，其中，所说的底物稀释液组成比例为柠檬酸3~6g，磷酸氢二钠1~3g，双蒸水500ml~1000ml。

9. 根据权利要求1-8之一所述的试剂盒，其中，所说的底物溶液为30%过氧化氢10~15mL和邻苯二胺固体粉末40~120mg。

10. 根据权利要求1-9之一所述试剂盒，其中，所说的反应终止液为2mol/L硫酸。

分析残留甲萘威的酶联免疫吸附测定试剂盒

(一)技术领域

本发明涉及一种适用于针对残留甲萘威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甲萘威残留。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。

甲萘威(Carbaryl)，自1953年由美国联合碳化物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、棉花等经济作物的害虫防治。但是由于甲萘威对人畜的毒性相当高，且有内吸性，近年来，因甲萘威中毒的报道，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。因此，开发一种简单快速，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。

检测甲萘威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。免疫分析为甲萘威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。现有技术中如中国发明专利公开CN1431503A和CN1431501A，均公开了针对各种常见检测比较麻烦的农药残留或代谢物检测的试剂盒，其中包括了检测甲基对硫磷和硫磷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检测甲萘威的技术。

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，得到了一种适用于针对甲萘威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检测甲萘威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快速检测残留甲萘威的试剂盒。

【技术方案】

本发明涉及一种用于甲萘威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甲萘威包被抗原，盒内试剂包含抗甲萘威抗体、甲萘威标准溶液、酶标记抗甲萘威抗体。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甲萘威抗体特异性结合反应的包被抗原，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、抗甲萘威抗体(间接ELISA)、甲萘威标准溶液、酶标甲萘威抗体例如辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体(适用于间接竞争ELISA法)或辣根过氧化物酶标记抗甲萘威兔抗体(适用于直接竞争ELISA法)、底物溶液和反应终止液。

其中固相包被抗原的制备及盒体内试剂组成如下：

将包被抗原(CBRH-OVA)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0.5~4 μ g/mL，点于96孔/40孔酶标板上，100 μ g/孔，并用5%明胶封闭；其中包被抗原为例如N-(α -萘乙酰基)-6-氨基己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-200.5~3mL、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；

抗甲萘威抗体(IgG)4瓶，100ml/瓶，工作浓度为1:500~1000(间接ELISA法)；所述的抗甲萘威抗体(IgG)为通过甲萘威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甲萘威分子、甲萘威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甲萘威兔抗体(直接ELISA法)或者辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体(间接ELISA法)一瓶，200~400 μ L/瓶，为正常使用时800~1500倍浓缩液；上述辣根过氧化物酶标抗甲萘威抗体为甲萘威抗体(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；

甲萘威不同浓度系列(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。

本发明的适用于甲萘威残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒，能够检测水样、土壤、中毒样品、蔬菜等食品中甲萘威的残留。

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包被抗原吸附于固相载体上，然后加入待测农药和抗甲萘威抗体(间接ELISA法)或酶标抗甲萘威抗体(直接ELISA法)。包被抗原、待测农药与抗甲萘威抗体(或酶标抗甲萘威抗体)进行竞争反应，待测农药含量多，则被结合在包被抗原上的抗体少，最终酶促反应显色浅，反之结合在包被抗原的抗体(或酶标抗体)多，最终酶促反应

显色深。上述包被抗原、待测农药、抗甲萘威抗体或酶标抗甲萘威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)。当抗体或酶标抗体量一定时，样品中的待测农药量越多，与包被抗原结合的酶标抗体就越少，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。

抗甲萘威抗体的制备

将人工合成的甲萘威免疫原(即甲萘威半抗原与牛血清白蛋白结合形成的偶联物(CBRH-BSA))多次注射家兔刺激其体的免疫系统产生能对甲萘威农药分子或甲萘威包被原(甲萘威半抗原与卵清蛋白人工合成的偶联物(CBRH-OVA))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、选择甲萘威半抗原与载体蛋白结合比在20~30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。待琼脂扩散效价达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、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 PH 7.0 P.B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：将纯化后的抗体溶液用生理盐水稀释适当倍数后测OD₂₈₀，按下式计算免IgG含量

$$\text{IgG g\%} = \frac{\text{OD}_{280}}{13.5} \times \text{稀释倍数}$$

4、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1mL蒸馏水中，于上液中加入0.2~0.4mL新配的0.1mol/L NaIO₄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1mmol/LpH4.4的醋酸盐缓冲液透析，4℃过夜。加20~40μl0.2mol/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纯化抗体的0.01mol/L碳酸盐缓冲液，室温避光轻轻搅拌2~3小时。加0.1~0.2mL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6400。

甲苯威人工抗原(含包被原)合成与鉴定

称取N-(α -萘乙酰基)-6-氨基己酸(CBRH)60mg溶于3ml无水DMF, 开启搅拌, 加入80 μ l三正丁胺, 冰浴下缓慢滴加同1ml无水DMF溶解的氯甲酸异酯40 μ l, 加毕, 4 $^{\circ}$ C搅拌反应1小时, 然后于室温反应1.5小时。

称取BSA、OVA各40ml, 分别溶于4ml0.05mol/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 $^{\circ}$ C左右。加毕, 室温搅拌反应12小时。

将反应液置透析袋中, 于4 $^{\circ}$ C下对0.01mol/L、pH7.4PB透析, 每6小时换一次缓冲液, 直至透析液中测不出N-(α -萘乙酰基)-6-氨基己酸(CBRH)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OD₂₉₃约为0.4~0.8。配制N-(α -萘乙酰基)-6-氨基己酸(CBRH)溶液使其浓度为20 μ g/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N-(α -萘乙酰基)-6-氨基己酸(CBRH)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OD₂₉₂, 分别计算各自的摩尔吸光数 ϵ_{292} 。按下式计算N-(α -萘乙酰基)-6-氨基己酸(CBRH)与载体蛋白的结合比。

$$\text{结合比} = \frac{\epsilon_{292}(\text{偶联物}) - \epsilon_{292}(\text{载体蛋白})}{\epsilon_{292}(\text{CBRH})}$$

甲苯威半抗原的合成

称取0.015mol α -萘乙酸加入100ml三口瓶中, 用30ml苯溶解, 室温下加入0.015molSOCl₂搅拌反应半小时, 再升温回流搅拌反应4小时(反应生成的HCl用NaOH水溶液吸收), 将反应液冷却至室温, 搅拌下滴加0.02mol 6-氨基己酸钠溶液, 室温搅拌反应3小时, 静置分层, 取水相, 苯层用pH=10的碳酸钠缓冲液, 合并水相, 冰浴下用5mol/LHCl调至pH=12左右, 有白色沉淀产生, 滤取沉淀, 滤液用乙醚取, 合并乙醚提取液, 用20mlpH=2~3的HCl洗涤一次, 乙醚层用Na₂SO₄干燥, 过滤, 蒸除乙醚, 合并沉淀, 用CH₃COOC₂H₅重结晶, 得N-(α -萘乙酰基)-6-氨基己酸(CBRH)2.2克, m.p: 90~92 $^{\circ}$ C。

H' -NMR δ (ppm)(内标TMS、溶剂 $CDCl_3$): 0.9~1.6(m, 6H, $-CH_2-CH_2-CH_2-$), 2.0~2.3(t, 2H, $-CH_2-COO$), 2.9~3.2(q, 2H, $-NH-CH_2-$), 4.0(s, 2H, CH_2-CO-), 5.8(s, 1H, NH), 7.2~8.0(m, 7H, Ar-H), 10.7(s, 1H, COOH).

包被酶标板的制备

包被抗原(CBRH-OVA)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0.5~4 μ g/mL, 在酶标板的每孔加100 μ 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150 μ L5%明胶, 放入37 $^{\circ}$ C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: 取出一块包被有甲萘威包被抗原酶标板, 恢复到室温后备用; 加入50 μ L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50 μ L稀释的酶标抗体, 37 $^{\circ}$ C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200 μ L稀释好的PBST洗2~6次, 拍干; 然后每孔加入100 μ L底物液, 轻微振匀, 并在37 $^{\circ}$ C暗处孵育15~25分钟进行显色反应; 加入50 μ L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: 取出一块包被有甲萘威包被抗原酶标板, 恢复到室温后备用; 加入50 μ L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50 μ L稀释的抗体，37 $^{\circ}$ C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200 μ L稀释好的PBST洗2~6次；加入100 μ L稀释好酶标二抗，37 $^{\circ}$ C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200 μ L稀释好的PBST洗2~6次；然后每孔加入100 μ L底物液与显色物质的混和液，轻微振匀，并在37 $^{\circ}$ C暗处孵育15~25分钟进行显色反应；加入50 μ L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

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\min})}{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min})} \times 100\%$$

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甲萘威浓度(mg/L)的半对数坐标系统曲线图，直接竞争ELISA法的校正曲线在0.01~10 mg/L范围内为线性；间接竞争ELISA法的校正曲线在0.005~10 mg/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】

本发明的优点是能用于水样、土壤、中毒样品、蔬菜等食品中甲萘威残留的检测，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。

(四)附图说明

图1是直接竞争ELISA法甲萘威标准曲线；

图2是间接竞争ELISA法甲萘威标准曲线。

(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N-(α -萘乙酰基)-6-氨基己酸与卵清蛋白的复合物作为包被抗原(CBRH-OVA)，将其用pH为9.6的0.05mol/L碳酸盐缓冲溶液(含1g碳酸钠和4g碳酸氢钠，双蒸水1L)稀释成4 μ g/mL，点于96孔/40孔酶标板上，100 μ g/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、抗甲萘威抗体(间接ELISA)、甲萘威标准溶液、辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体(适用于间接竞争ELISA法)、辣根过氧化物酶标记抗甲萘威兔抗体(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；

甲萘威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甲萘威分子、甲萘威包被原特异性结合的免疫球蛋白(IgG)，抗甲萘威抗体(IgG)400ml，工作浓度为1:1000(间接ELISA法)；

辣根过氧化物酶标记抗甲萘威兔抗体(直接ELISA法)或者辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体(间接ELISA法)200 μ L，为正常使用时800~1500倍浓缩液；上述辣根过氧化物酶标抗甲萘威抗体为甲萘威抗体(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；

甲萘威不同浓度系列(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。

试剂盒中采用N-(α -萘乙酰基)-6-氨基己酸与卵清蛋白的复合物作为包被抗原(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0.5 μ g/mL, 点于96孔/40孔酶标板上, 100 μ g/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、抗甲萘威抗体(间接ELISA)、甲萘威标准溶液、辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体(适用于间接竞争ELISA法)、辣根过氧化物酶标记抗甲萘威兔抗体(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;

甲萘威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甲萘威分子、甲萘威包被原特异性结合的免疫球蛋白(IgG), 抗甲萘威抗体(IgG)400ml, 工作浓度为1:500(间接ELISA法);

辣根过氧化物酶标记抗甲萘威兔抗体(直接ELISA法)或者辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体(间接ELISA法)400 μ L, 为正常使用时800~1500倍浓缩液; 上述辣根过氧化物酶标抗甲萘威抗体为甲萘威抗体(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;

甲萘威不同浓度系列(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N-(α -萘乙酰基)-6-氨基己酸与卵清蛋白的复合物作为包被抗原(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0.5 μ g/mL, 点于96孔/40孔酶标板上, 100 μ g/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、抗甲萘威抗体(间接ELISA)、甲萘威标准溶液、辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体(适用于间接竞争ELISA法)、辣根过氧化物酶标记抗甲萘威兔抗体(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；

甲萘威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甲萘威分子、甲萘威包被原特异性结合的免疫球蛋白(IgG)，抗甲萘威抗体(IgG)400ml，工作浓度为1:750(间接ELISA法)；

辣根过氧化物酶标记抗甲萘威兔抗体(直接ELISA法)或者辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体(间接ELISA法)300 μ L，为正常使用时800~1500倍浓缩液；上述辣根过氧化物酶标抗甲萘威抗体为甲萘威抗体(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；

甲萘威不同浓度系列(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N-(α -萘乙酰基)-6-氨基己酸与卵清蛋白的复合物作为包被抗原(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0.5 μ g/mL，点于96孔/40孔酶标板上，100 μ g/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、抗甲萘威抗体(间接ELISA)、甲萘威标准溶液、辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体(适用于间接竞争ELISA法)、辣根过氧化物酶标记抗甲萘威兔抗体(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;

甲萘威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甲萘威分子、甲萘威包被原特异性结合的免疫球蛋白(IgG), 抗甲萘威抗体(IgG)400ml, 工作浓度为1:700(间接ELISA法);

辣根过氧化物酶标记抗甲萘威兔抗体(直接ELISA法)或者辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体(间接ELISA法)200 μ L, 为正常使用时800~1500倍浓缩液; 上述辣根过氧化物酶标抗甲萘威抗体为甲萘威抗体(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;

甲萘威不同浓度系列(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

将试验试剂盒放置于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 _{450nm} (4℃)	1.069	1.067	1.066	1.064	1.063	1.062	1.062	1.060	1.058
OD _{450nm} (20℃)	1.067	1.064	1.063	1.062	1.062	1.060	1.060	1.059	1.057

表 2.间接竞争 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 _{450nm} (4℃)	1.115	1.115	1.112	1.112	1.110	1.106	1.110	1.100	1.009
OD _{450nm} (20℃)	1.120	1.120	1.115	1.113	1.110	1.109	1.08	1.105	1.100

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

将甲萘威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(图1)，由图可得，直接ELISA法为： $y=44.92+16.44x$ ，甲萘威在0.01mg/L~10mg/L范围内，Logit(B/B₀)与甲萘威深度的对数值呈显著的线性关系，相关系数为 $r^2=0.9431$ ，检出限为0.01mg/L。用间接ELISA法分析分别得到以下曲线(图2)，由图可得，间接ELISA法为： $y=63.34+9.82x$ ，甲萘威在0.005mg/L~10mg/L范围内，Logit(B/B₀)与甲萘威浓度的对数值呈显著的线性关系，相关系数为 $r^2=0.9845$ ，检出限为0.005mg/L。

3、准确度试验精密度试验

取三个浓度的甲萘威标样，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96.8%~106.8%，蔬菜为110.8%~117.5%。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

选择甲萘威的类似物如克百威、灭多威、 α -萘酚，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甲萘威的交叉反应性。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，甲

萘威所需浓度为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，可保证对样品中甲萘威残留测定结果的可靠性。

表 3. 试剂盒特异性试验

化合物名称	抑制中浓度 (ug/ml)	交叉反应百分率 (%)
甲萘威	0.0118	/
克百威	53.15	0.022
灭多威	1860	<0.001
α -萘酚	2.52	0.47

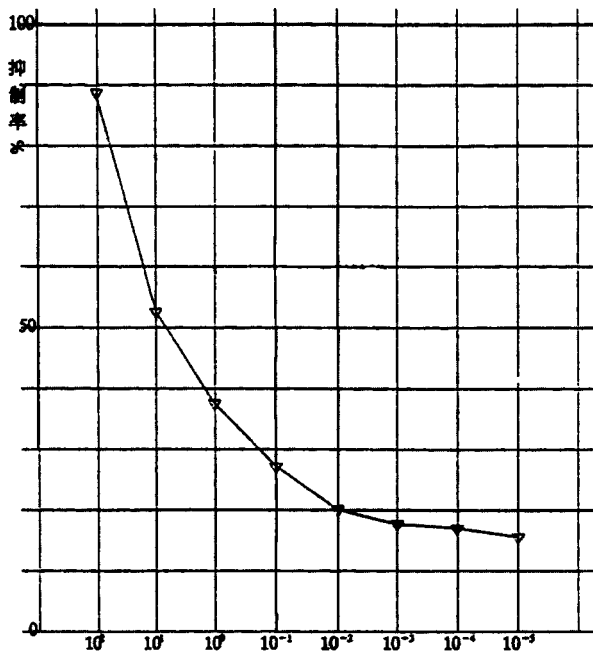


图 1

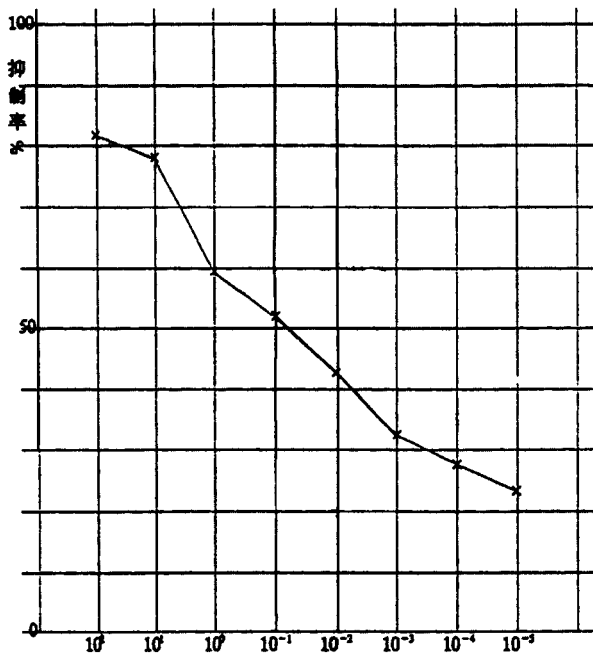


图 2

专利名称(译)	分析残留甲萘威的酶联免疫吸附测定试剂盒		
公开(公告)号	CN1523356A	公开(公告)日	2004-08-25
申请号	CN03156784.3	申请日	2003-09-12
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院蔬菜花卉研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院蔬菜花卉研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院蔬菜花卉研究所		
[标]发明人	张友军 孙家隆 王升吉 尚佑芬 赵玫华 杨崇良 祁凯 徐宝云 吴青君 路兴波 孙红炜		
发明人	张友军 孙家隆 王升吉 尚佑芬 赵玫华 杨崇良 祁凯 徐宝云 吴青君 路兴波 孙红炜		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/558 G01N33/573		
代理人(译)	向华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种适用于甲萘威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甲萘威抗体特异性反应的包被抗原，并用明胶进行封闭，盒内试剂包含洗涤液、底物稀释液、甲萘威标准溶液、抗甲萘威抗体、酶标抗甲萘威抗体、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甲萘威残留的快速检测，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。

$$\text{IgG g\%} = \frac{\text{OD}_{280}}{13.5} \times \text{稀释倍数}$$