

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/531 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810183481.9

[43] 公开日 2009年7月8日

[11] 公开号 CN 101477115A

[22] 申请日 2008.12.18

[21] 申请号 200810183481.9

[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5页

[54] 发明名称

毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体及通用包被抗原的制备

[57] 摘要

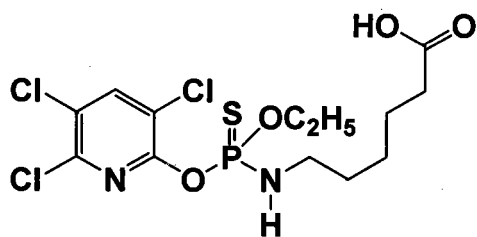
本发明公开了一种适用于同时分析毒死蜱和甲基对硫磷残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒的毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体及通用包被抗原制备,它包括毒死蜱人半工抗原和甲基对硫磷人工半抗原结构以及毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体及通用包被抗原制备方法。本发明制备的毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体及通用包被抗原可用于制备适用于同时分析毒死蜱和甲基对硫磷残留分析的酶联免疫吸附测定试剂盒,该试剂盒能用于水、土壤、蔬菜等食品中及中毒样品中毒死蜱残留和甲基对硫磷的快速检测,样品的前处理过程简单,能同时检测批量的样品,样品检测成本低于传统的检测方法。

1. 一种适用于同时分析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的毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体及通用包被抗原制备, 其特征在于, 毒死蜱人工半抗原和甲基对硫磷人工半抗原以一定比例与牛血清白蛋白结合制得通用人工抗原, 按照常规方法使用新西兰白兔免疫制备毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体, 毒死蜱人工半抗原和甲基对硫磷人工半抗原以一定比例与卵清蛋白结合按照常规方法制备毒死蜱和甲基对硫磷通用包被抗原。

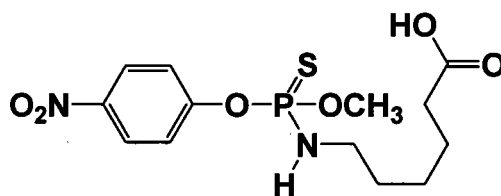
2. 根据权利要求 1 的通用毒死蜱人工抗原和甲基对硫磷人工抗原, 其特征在于毒死蜱人工半抗原、甲基对硫磷人工半抗原和牛血清白蛋白通过如下重量比例反应制备:

毒死蜱人工半抗原: 甲基对硫磷人工半抗原: 牛血清白蛋白 = 87mg: 72mg: 120mg

毒死蜱人工半抗原和甲基对硫磷人工半抗原化学结构如下:



毒死蜱人工半抗原



甲基对硫磷人工半抗原

3. 根据权利要求 1 的毒死蜱和甲基对硫磷通用包被抗原, 其特征在于毒死蜱人工半抗原、甲基对硫磷人工半抗原和卵清蛋白通过如下重量比例进行反应制备:

毒死蜱人工半抗原: 甲基对硫磷人工半抗原: 卵清蛋白 = 87mg: 72mg: 240mg

4. 根据权利要求 1 所述的毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体及通用包被抗原, 其特征在于该通用抗体及通用包被抗原用于制备同时分析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。

毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体及通用包被抗原的制备

(一) 技术领域

本发明属于残留农药检测领域，涉及一种适用于同时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的毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体及通用包被抗原的制备。

(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。目前的文献和专利公开了用于分

析残留毒死蜱的酶联免疫吸附测定试剂盒或分析残留甲基对硫磷的酶联免疫吸附测定试剂盒及其制备方法，而现有技术中没有同时分析残留毒死蜱和甲基对硫磷的酶联免疫吸附测定试剂盒及其制备方法的技术。

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，得到了适用于同时分析残留毒死蜱和甲基对硫磷的酶联免疫吸附测定试剂盒的关键原料毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体及通用包被抗原的制备技术。使用本发明的毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体及通用包被抗原制备的同时分析残留毒死蜱和甲基对硫磷的酶联免疫吸附测定试剂盒保质期不低于1年，对残留毒死蜱和甲基对硫磷在蔬菜中的最低检出浓度分别为12.0、10.0 ng/ml。

(三)发明内容

【要解决的问题】

本发明的目的是提供一种毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体及通用包被抗原的制备技术。

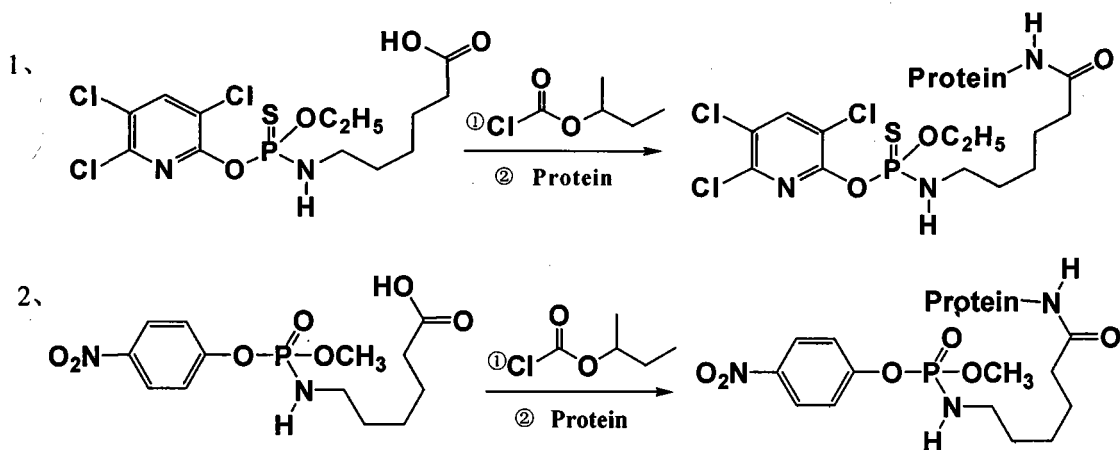
本发明的另一目的是本发明所制备的毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体及通用包被抗原可以用于制备同时分析残留毒死蜱和甲基对硫磷的酶联免疫吸附测定试剂盒。

毒死蜱人工半抗原、甲基对硫磷人工半抗原同时和牛血清白蛋白反应制备毒死蜱和甲基对硫磷通用人工抗原是本发明的重要特征之一。

毒死蜱人工半抗原、甲基对硫磷人工半抗原同时和卵清蛋白反应制备毒死蜱和甲基对硫磷通用包被抗原是本发明的另一重要特征。

【技术方案】

毒死蜱和甲基对硫磷通用人工抗原制备：毒死蜱人工半抗原、甲基对硫磷人工半抗原同时和牛血清白蛋白反应，同时发生如下两个反应：



操作步骤：计算量的人工半抗原、三正丁胺分别溶于DMF中的两混合物a和b，将b加于a中得混合物c。将溶解有氯甲酸异丁酯的DMF溶液于4℃滴加

到 c 中, 反应 1 小时得 d。将计算量牛血清白蛋白溶于定量 PH = 8.7、0.05M 的硼酸盐缓冲溶液中, 然后于 18℃ 以下将 d 滴加其中, 室温反应 12 小时。所得反应液装入透析袋, 于 PH = 7.4、0.01M 缓冲溶液中 4℃ 条件透析至透析液中检不出半抗原紫外吸收 (OD_{282}), 精确量取透析后的蛋白质溶液体积, 测定蛋白质浓度和结合比为 40 ~ 50, 分装, -20℃ 保存。

毒死蜱和甲基对硫磷通用包被抗原制备: 将毒死蜱和甲基对硫磷通用人工抗原制备中的牛血清白蛋白换成卵清蛋白并且减半使用, 用相同的操作方法即可制得毒死蜱和甲基对硫磷通用包被抗原, 结合比为 20 ~ 30, 分装, -20℃ 保存。

毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体的制备

将人工合成的毒死蜱和甲基对硫磷免疫原(即毒死蜱人工半抗原和甲基对硫磷人工半抗原与牛血清白蛋白结合形成的偶联物(CBRH-BSA))多次注射新西兰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(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、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_4^+ ；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 OD_{280} ，按下式计算免 IgG 含量

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

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 5-10mg HRP 溶解于 1ml 蒸馏水中，于上液中加入 0.2-0.4mL 新配的 0.1mol/L NaIO_4 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/L pH4.4 的醋酸盐缓冲液透析，4℃ 过夜。加 20-40uL 0.2mol/L pH9.5 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 0.14).2mL 新配的 4mg/mL NaBH_4 液，混匀，再置 4℃ 2-3 小时。将反应液装入透析袋中，用 0.15mol/L pH7.4 PBS 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/L pH7.4℃ 的 PBS 中。将上述溶液装入透析袋中，对 0.15mol/L pH7.4 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 62000。

【有益效果】

本发明的优点是应用本发明毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体制备的试剂盒，能用于水样、土壤、中毒样品、蔬菜等食品中毒死蜱和甲基对硫磷残留的同时检测，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。

(五)具体实施方式

以下用实施例对本发明作进一步说明：

人工抗原制备：d 毒死蜱人工半抗原、甲基对硫磷人工半抗原 60mg、72mg 溶于 5.0mlDMF 中。e 三正丁胺 0.2mL 溶于 5.0mlDMF 中，e 加于 d 中得 f。氯甲酸异丁酯 0.16mL 溶于 10mlDMF 中，4℃滴加到 f 中，反应 1 小时得 g。牛血清白蛋白 120mg 溶于 60mLPH = 8.7、0.05M 的硼酸盐缓冲溶液中，然后于 18℃以下将 g 滴加其中，室温（~20℃）反应 12 小时。所得反应液装入透析袋，于 PH = 7.4、0.01M 缓冲溶液中 4℃条件透析 60 小时，每 8 小时换一次 PBS 透析液，每次 1L。至透析液中检不出半抗原紫外吸收（OD₂₈₂）。精确量取透析后的蛋白质溶液体积，测定蛋白质浓度和结合比为 46，分装，-20℃保存。

人工包被抗原制备：d 毒死蜱人工半抗原、甲基对硫磷人工半抗原 60mg、72mg 溶于 5.0mlDMF 中。e 三正丁胺 0.2mL 溶于 5.0mlDMF 中，e 加于 d 中得 f。氯甲酸异丁酯 0.16mL 溶于 10mlDMF 中，4℃滴加到 f 中，反应 1 小时得 g。卵清蛋白 240mg 溶于 60mLPH = 8.7、0.05M 的硼酸盐缓冲溶液中，然后于 18℃以下将 g 滴加其中，室温（~20℃）反应 12 小时。所得反应液装入透析袋，于 PH = 7.4、0.01M 缓冲溶液中 4℃条件透析 60 小时，每 8 小时换一次 PBS 透析液，每次 1L。至透析液中检不出半抗原紫外吸收（OD₂₈₂）。精确量取透析后的蛋白质溶液体积，测定蛋白质浓度和结合比为 25，分装，-20℃保存。

专利名称(译)	毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体及通用包被抗原的制备		
公开(公告)号	CN101477115A	公开(公告)日	2009-07-08
申请号	CN200810183481.9	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	G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种适用于同时分析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的毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体及通用包被抗原制备，它包括毒死蜱人工抗原和甲基对硫磷人工抗原结构以及毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体及通用包被抗原制备方法。本发明制备的毒死蜱和甲基对硫磷通用抗体及通用包被抗原可用于制备适用于同时分析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，该试剂盒能用于水、土壤、蔬菜等食品中及中毒样品中毒死蜱残留和甲基对硫磷的快速检测，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。

