

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380110943.X

[43] 公开日 2006年12月27日

[11] 公开号 CN 1886660A

[22] 申请日 2003.12.31

[21] 申请号 200380110943.X

[86] 国际申请 PCT/IN2003/000446 2003.12.31

[87] 国际公布 WO2005/064331 英 2005.7.14

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.29

[71] 申请人 科学与工业研究委员会

地址 印度新德里

[72] 发明人 姆纳·辛弗·萨库尔

奈坎卡特·卡纳什·卡兰斯

麦斯奥·阿楠萨拉麦阿·库玛尔

班咖劳尔·艾什瓦尔·阿米塔拉尼

阿蒂玛尔·帕沙

尼蒂如·高帕拉·克瑞什纳·卡兰斯

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司

代理人 王达佐 韩克飞

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 2 页

[54] 发明名称

用于杀虫剂分析的方法和试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种利用免疫化学发光在 ppt 水平快速检测杀虫剂的方法。该方法包括将固定抗体装填于玻璃毛细管柱中，将欲检测杀虫剂含量的样品溶液通过所述的柱形成杀虫剂-抗体复合物，从柱中除去所述的杀虫剂-抗体复合物，然后加入尿素 H_2O_2 ，再加入发光氨和 $K_3Fe(CN)_6$ ，将所述的溶液充分混合直到产生光，然后以 CCD 照相机捕获产生的光，产生的光强度与所述样品中的杀虫剂含量成正比。本发明还公开了一种实施本发明方法的试剂盒。

1. 利用免疫化学发光在 ppt 水平快速检测杀虫剂的方法, 包括:
将在玻璃毛细管柱中填装的固定抗体填装, 将欲检测杀虫剂含量的样品溶液通过所述柱从而形成杀虫剂-抗体复合物, 从所述柱中除去所述的杀虫剂-抗体复合物, 然后加入尿素 H_2O_2 , 再加入发光氨和 $K_3Fe(CN)_6$, 将所述的溶液充分混合直到产生光, 然后以 CCD 照相机捕获产生的光, 所产生的光强度与所述样品中的杀虫剂含量成正比。
2. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述的抗体包括由鸡产生的甲基对硫磷(MP)抗体, 其从蛋黄中纯化(IgY-MP), 然后固定于琼脂糖基质上。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中所述的尿素 H_2O_2 使用范围为 10-50 μl 。
4. 如前述任一权利要求所述的方法, 其中所述的发光氨使用范围为 10-50 μl 。
5. 如前述任一权利要求所述的方法, 其中所述的 $K_3Fe(CN)_6$ 使用范围为 10-150 μl 。
6. 如前述任一权利要求所述的方法, 其中加入尿素 H_2O_2 后, 将所述的杀虫剂-抗体复合物于室温保持约 2 分钟。
7. 如前述任一权利要求所述的方法, 其中向所述的柱加入磷酸盐缓冲液以洗涤未被结合的杀虫剂。
8. 利用免疫化学发光在 ppt 水平快速检测杀虫剂的试剂盒, 包括用于填装固定抗体的毛细管柱, 欲检测杀虫剂含量的样品溶液源, 所述样品溶液源与所述的柱可操作地连接, 与所述的柱可操作地连接的杀虫剂

源，与所述的柱可操作地连接的缓冲液源，与所述的柱可操作地连接的尿素 H_2O_2 源，与所述的柱可操作连接的发光氨源，及与所述的柱可操作连接的 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 源，以致将所有的试剂充分混合，直到产生光，并捕获所产生的光，以及记录所产生的光强度的 CCD 照相机，所述光强度为所述样品中存在的杀虫剂水平的函数。

9. 如权利要求 7 所述的试剂盒，其中将计算机与所述的 CCD 照相机连接，以将所述检测样品产生的光与对照样品进行比较。

用于杀虫剂分析的方法和试剂盒

发明领域

本发明提供了一种基于电荷耦联装置的用于杀虫剂分析的快速检测试剂盒。本发明还提供了一种基于电荷耦联装置的用于杀虫剂分析的检测试剂盒的制造方法，及其用于检测水、食物和环境中的杀虫剂水平的用途。

发明背景

与水与农业有关的环境保护迫切需要对人类健康的关注。由于使用污染的水和食物，发生了重大健康问题。许多国家在农业中应用有机氯和有机磷杀虫剂。近几十年来，由于在农业中增加使用杀虫剂，地表水、食物原料和食品正被杀虫剂残留物污染。

污染监测和保护机构需要快速灵敏的分析污染物的方法。通常用于杀虫剂分析的分析方法包括液相色谱法、气相色谱法以及 ELISA 法 (Lehotay, S. J., 通过直接的样品导入/气相色谱/质谱法联用对水果和蔬菜的混合提取物中的杀虫剂残留物的分析, J. AOAC Int., 2002, 83, 680-697; Sasaki. K., Suzuki. K., and Sito. Y., (1987) ‘作物中有机磷杀虫剂的简易清除和气相色谱检测’ Journal of the Association of Official analytical Chemists International, 70, 460-464. Fernandez. M., Pico, Y., Girotti, S., Manes, J., ‘通过液相色谱-大气压化学电离-质谱法分析蜜蜂体内有机磷杀虫剂’, J. Agric. Food chem. 2001, 49, 3540-3547)。

这些传统方法的灵敏度达到了 ppb 水平，但耗时、费力且需要熟练的技术员和昂贵的仪器装置。生物传感器是另一种快速、经济地检测杀虫剂装置方法。应用生物传感器对杀虫剂进行快速定性检测方面的文献很少。特别是，没有快速定性方法用于检测水和食物材料中的甲基对硫磷(MP)杀虫剂残留物。

参见美国专利 6,569, 384 (发明者: Greenbaum; Elias (Oak Ridge, TN); Sanders; Charlene A. (Knoxville, TN) May 27, 2003, '用于检测化学战剂的基于组织的水质生物传感器')。他们描述了一种装置, 用于将水导入细胞和将水从细胞中导出, 用于分析自然发生的、自由生活的天然光合生物在水中的光合活性; 一种用于测定导入细胞中的有机体的光合活性的荧光计; 以及一种用于分析荧光计的原始数据和发出信号的电子包, 表明至少存在一种 $\mu\text{g/ml}$ (ppm 水平) 浓度的杀虫剂。该方法的局限为, 对杀虫剂的检测仅达到 ppb 水平、耗时, 并且对任何杀虫剂都不是特异性的。该方法将非特异性地对许多有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂作出反应。

参见纤维素试纸免疫测定法, 其描述于 Mosiello, L., Cremisini, C., Sergre, L., Chiavarini, S. and Spano, M. (1998), 用于分析水样品中的萎去津和特丁津的纤维素试纸免疫测定方法. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3847-3851 中。在该方法中, 将抗体固定于尼龙膜上, 当他们使用反射仪时, 检测极限为 1.2 至 $10 \mu\text{g/L}^{-1}$ (ppb 水平)。该方法的检测极限为 ppb 水平。报道显示, 存在于该方法中的主要问题是精确度不够, 可能是因为尼龙膜或聚苯乙烯透明膜(transperants)上的单克隆抗体的同质性以及彩色 TMB 电荷转移复合体不稳定。

可参见用于杀虫剂检测的检测试剂盒和方法, 其描述于 Eliezer, Z., Steven, S. Stanely E. C, Sciences, C 的 W093 14222 中。在此出版物中, 描述了将昆虫脑用作生物传感器。然而, 该专利未描述杀虫剂的检测极限或分析所需的持续时间。

上述报道的现有技术方法耗时。此外, 大多数已知方法对分析物是非特异性的, 并需要使用者具有良好的技术知识。因此, 需要一种改进的方法和检测试剂盒用于杀虫剂分析。

发明目的

因此, 本发明的一个重要目的是提供一种用于杀虫剂检测的快速检测试剂盒, 该试剂盒消除了上述缺点。

本发明的另一个目的是提供一种用于杀虫剂检测的快速灵敏(ppb 水平)的检测试剂盒, 该试剂盒使用免疫化学发光原理。

发明概述

本发明利用一种新的方式，化学发光(CL)和生化反应产生光，其具有高灵敏度(ppt 水平)上与杀虫剂浓度呈正比，达到了本发明的上述和其它目的。目前还没有关于使用化学发光(CL)检测杀虫剂特别是甲基/乙基对硫磷(MP/EP)的报道。据悉，基于 CL 的检测试剂盒检测极低浓度的分析物是非常灵敏的。CL 方法具有众多优点，如分析灵敏快速、结果可靠且设备低廉，因此，该检测试剂盒已成为杀虫剂检测中的一种引人注目的分析工具。这方面，参见(J Wang C. Zhang, H. Wang, F. Yang and X. Zhang, 2001, 用于敌敌畏杀虫剂检测的基于发光氨的化学发光流式注射法进展, 54,1185-1193)，其中他们已在 ppm 水平上(0.2 - 3.1 $\mu\text{g/ml}$)检测到敌敌畏。然而，该方法不能用于甲基对硫磷的检测。应当注意，在上述提及的现有技术方法中均未包括抗体-抗原反应。相反，本发明的新颖性在于抗体-抗原反应的使用，对电荷耦联装置(CCD)耦联的杀虫剂是特异性的。使用化学发光和 CCD 照相机高灵敏地(达到 ppt 水平)检测杀虫剂未见报道。本发明开发的基于 CL 的检测试剂盒能使快速、灵敏的杀虫剂检测达到 ppt 水平。本发明的另一新颖性在于使用了如铁氰化钾的电子介质，以放大产生的非常低水平的光信号，因此能从 ppm 至 ppt 水平清楚地区别不同的杀虫剂浓度。

发明详述

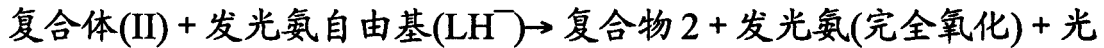
现在将参考以下附图详细地描述本发明，其中：

图 1 显示利用过氧化氢的 HRP 酶催化的电子供体底物的氧化；及
图 2 显示本发明杀虫剂检测试剂盒使用的流程图。

基于免疫化学发光(ICL)的杀虫剂检测原理：

本发明基于下述发现，即在过氧化氢(H_2O_2)存在时，辣根过氧化物酶(HRP)催化发光氨(luminol, 鲁米诺)的氧化。发光氨一旦氧化即达到激发态，然后通过发光衰变到基态。使用该方法利用相应的抗体可检测各种杀虫剂，如乙基对硫磷(EP)和甲基对硫磷。

按照下述方案，HRP 酶利用过氧化氢催化电子供体底物的氧化。



杀虫剂检测:

将过量的 MP 抗体固定于免疫生物反应器柱中的载体基质上。杀虫剂分子与固定抗体结合。在此过程中，一些抗体位点(抗原决定簇)保持未结合状态。这些未结合位点可用于结合 MP-HRP-轭合物。将定量的 MP-HRP-轭合物通过该柱，因此，保留的抗体抗原决定簇位点被该轭合物占据。再将该抗体柱充分洗涤。将这些固定的具有基质的杀虫剂和 MP-HRP-轭合物的取出，然后用于上述化学发光反应。然而，在该反应中，产生的光强度非常低。为使光强度增强，加入电子介质 K_3FeCN_6 。杀虫剂浓度高时，有更多未反应的 H_2O_2 ，其与 K_3FeCN_6 反应，并产生增强的光强度，该光强度与杀虫剂浓度呈正比。

如图 1 所示，在过氧化氢(H_2O_2)存在时，辣根过氧化物酶(HRP)催化发光氨的氧化，发光氨一旦氧化，达到激发态，然后通过发光衰变到基态。使用该方法利用不同的抗体可检测不同的杀虫剂，如乙基对硫磷(EP)和甲基对硫磷。

图 2 示例性描述本发明的方法和试剂盒(或装置)。本发明的试剂盒(或装置)使用免疫化学发光在 ppt 水平快速检测杀虫剂，包括用于填充固定抗体的毛细管柱 6。将欲检测杀虫剂含量的样品溶液 2 源与所述的柱 6 可操作地连接。将缓冲液 1 源与所述的柱可操作地连接以平衡抗体并洗涤未被结合的杀虫剂。尿素 H_2O_2 发光氨和 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 源也可操作地与所述的柱 6 连接。优选地，将所有所述的试剂来源通过蠕动泵 5 与所述的柱 6 连接。混合的所述试剂导致发光，其发生在与所述的柱 6 连接的柱 7 I。将产生的光以 CCD 照相机 8 捕获，以记录产生的光强度，该照相机与计算机 9 连接，以与对照样品进行比较。

本发明检测水中存在杀虫剂的方法的优选实施方案包括下述:

(1).将从鸡中产生并从蛋黄中纯化(IgY-MP)的甲基对硫磷(MP)抗体,通过还原氯化固定于琼脂糖基质上(Hermanson G. T, A. K Mallia and Smitjh P. K, Immobilized affinity ligand techniques (固定亲和配体的技术) Academic press, 1992,69-75), 将该抗体加入装填的柱中后进行流式ELISA, 根据以下所述使用不同浓度的MP和MP-HRP 轭合物。2).将150 μl 固定抗体装填于玻璃毛细管柱中, 并以10倍柱床体积的冷PBS(pH7.4, 50 mM)平衡。将包含杀虫剂的50 μl 该溶液样品以50 $\mu\text{l}/\text{min}$ 流速过柱。3).持续通PBS 5min 以洗涤未被结合的杀虫剂。4).将25 μl MP-HRP 轭合物以50 $\mu\text{l}/\text{min}$ 流速过柱。5)使用包含0.1% BSA 的PBS 将未被结合的轭合物洗脱 15min。6).最后, 将包含基质的轭合物从柱中取出并用于下述的化学发光检测:

向上述获得的包含基质的50 μl 轭合物中加入25 μl 尿素 H_2O_2 (10mM 的 Milli Q 溶液), 于室温放置 2min。然后将25 μl 0.1mM 发光氨加至25 μl 0.5% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (在 Milli Q 水中制备), 充分混合。该过程中产生的光立即被暗室中的 CCD 照相机捕获。将图像中的光强度与不具有杀虫剂的对照相比较。发现对照组中产生的光较少, 而在包含杀虫剂的样品中产生的光较多。还观察到在杀虫剂浓度较高时产生的光较多, 而在包含较少杀虫剂的样品中观察到的光较少。

仅以示例性说明的方式给出下述实施例, 因此其不应构成对本发明范围的限制。

实施例:

该实施例示例性说明本发明, 如图2的流程所示。参见图2, 将150 μl 固定抗体装填于玻璃毛细管柱6中, 并以10倍柱床体积的冷PBS(pH7.4, 50 mM)平衡。将包含杀虫剂2的50 μl 样品溶液以50 $\mu\text{l}/\text{min}$ 流速通过柱6。连续5min 通PBS 1以洗涤未被结合的杀虫剂。将25 μl MP-HRP 轭合物3以50 $\mu\text{l}/\text{min}$ 流速过柱6。使用包含0.1% BSA 的PBS 1将未被结合的轭合物洗脱 15min。优选地, 将上述的所有试剂经由蠕动泵5通入柱6。最后, 将包含基质的轭合物从柱中取出用于下述的化学发光检测:

向上述获得的包含基质的 50 μl 混合物中加入 25 μl 尿素 H_2O_2 (10mM 的 Milli Q 溶液), 于室温放置 2min。如 7 所示, 然后将 25 μl 0.1mM 发光氨加至 25 μl 0.5% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 中, 充分混合。在此过程中产生的光立即被暗室中的 CCD 照相机 8 捕获。通过计算机 9, 将图像中的光强度与不含杀虫剂的对照组比较。

监测了不同浓度杀虫剂(MP), 包括 100ppb、1ppb、500ppt 和 10ppt 以及不含任何杀虫剂的对照组的 ICL 强度。能被识别的清晰可见的 CL 强度高达 10ppt。从图 2 底部可以看出, 在较低杀虫剂浓度时, 样品与对照之间的 CL 差异很难区别。该检测试剂盒装置可检测是否存在水平达 10ppt 的杀虫剂。

本发明用于杀虫剂分析的简易图像检测试剂盒可检测水、食物和环境中的杀虫剂, 甚至普通人也能够检测。

$\text{HRP} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{复合体1} + \text{H}_2\text{O}$

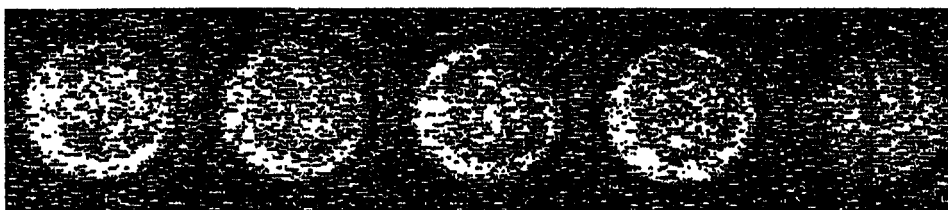
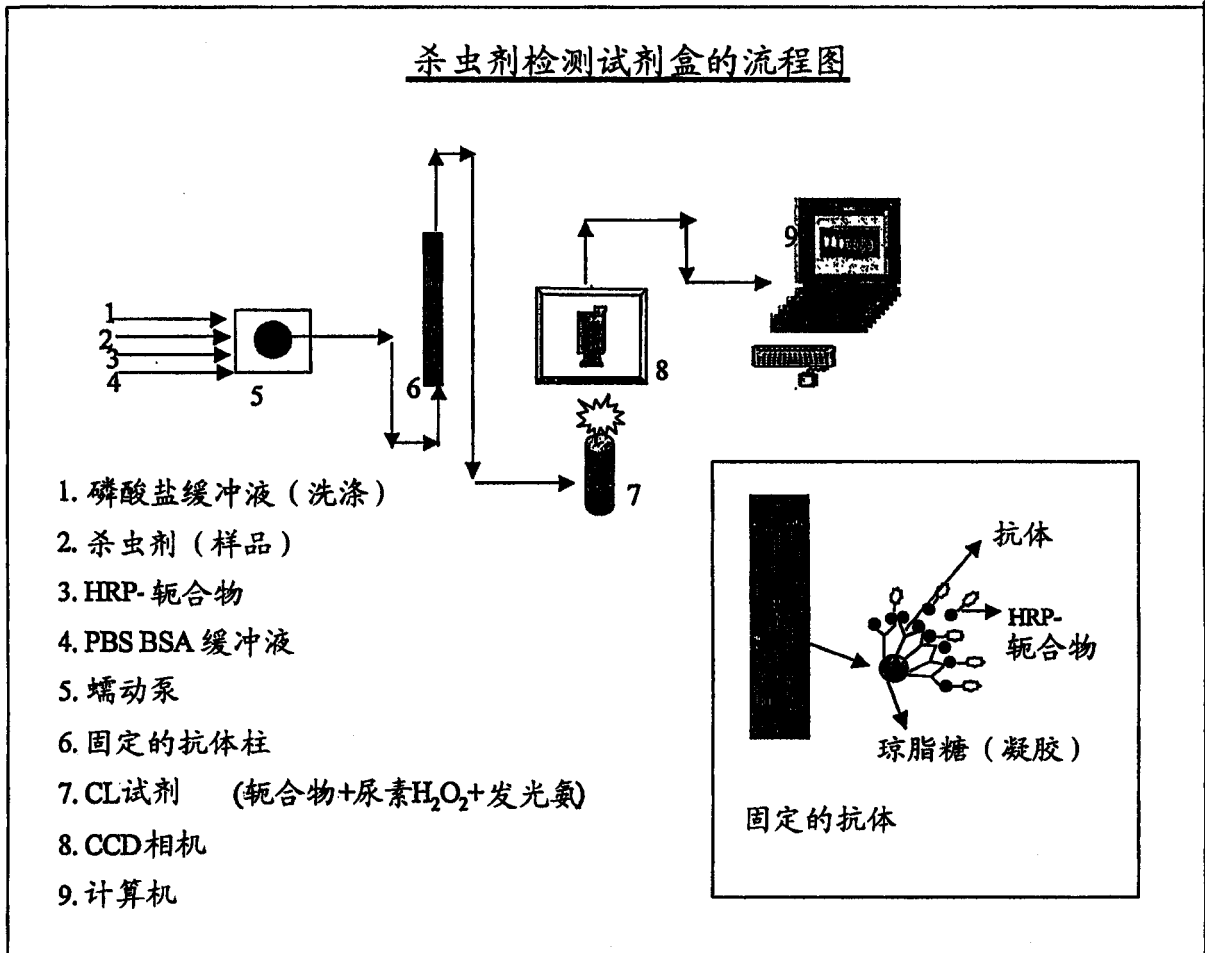
$\text{复合体(1)} + \text{发光氨}(\text{LH}_2) \rightarrow \text{复合体(II)} + \text{发光氨自由基}(\text{LH}^\cdot)$

$\text{复合体(II)} + \text{发光氨自由基}(\text{LH}^\cdot) \rightarrow \text{复合物2} + \text{发光氨(完全氧化)} + \text{光}$



HRP 酶利用过氧化氢催化电子供体底物的氧化

图 1



100
ppb

1ppb

500ppt

10ppt

Zero

图 2

专利名称(译)	用于杀虫剂分析的方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN1886660A	公开(公告)日	2006-12-27
申请号	CN200380110943.X	申请日	2003-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	科学与工业研究理事会		
申请(专利权)人(译)	科学与工业研究委员会		
当前申请(专利权)人(译)	科学与工业研究委员会		
[标]发明人	姆纳辛弗萨库尔 奈坎卡特卡讷什·卡兰斯 麦斯奥阿楠萨拉麦阿库玛尔 班咖劳尔艾什瓦尔阿米塔拉尼 阿蒂玛尔帕沙 尼蒂如高帕拉克瑞什纳·卡兰斯		
发明人	姆纳·辛弗·萨库尔 奈坎卡特·卡讷什·卡兰斯 麦斯奥·阿楠萨拉麦·库玛尔 班咖劳尔·艾什瓦尔·阿米塔拉尼 阿蒂玛尔·帕沙 尼蒂如·高帕拉·克瑞什纳·卡兰斯		
IPC分类号	G01N33/50 C12Q1/00 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2430/00 G01N33/5308		
代理人(译)	韩克飞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种利用免疫化学发光在ppt水平快速检测杀虫剂的方法。该方法包括将固定抗体装填于玻璃毛细管柱中，将欲检测杀虫剂含量的样品溶液通过所述的柱形成杀虫剂 - 抗体复合物，从柱中除去所述的杀虫剂 - 抗体复合物，然后加入尿素H₂O₂，再加入发光氨和K₃Fe(CN)₆，将所述的溶液充分混合直到产生光，然后以CCD照相机捕获产生的光，产生的光强度与所述样品中的杀虫剂含量成正比。本发明还公开了一种实施本发明方法的试剂盒。