

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410065318.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年4月25日

[11] 授权公告号 CN 1312478C

[22] 申请日 2004.11.25

[21] 申请号 200410065318.4

[73] 专利权人 南京农业大学

地址 210095 江苏省南京市卫岗1号南京
农业大学科技处 钱宝英

[72] 发明人 刘凤权 胡白石 张奇 徐丽娜
姜英华

[56] 参考文献

JP2004170392A 2004.6.17

CN1438485A 2003.8.27

CN1385704A 2002.12.18

审查员 郑其蔚

权利要求书1页 说明书6页

[54] 发明名称

农药速灭威残留量检测方法

[57] 摘要

本发明速灭威 (metolcarb) ELISA 检测方法属于农药残留分析及农产品安全检测范畴。检测方程为 $\text{Logit}(B/B_0) = -0.9404\text{Log}C + 1.5146$ (其中 B 为样品孔吸光值, B_0 为阳性对照吸光值, C 为板孔中测出的速灭威浓度), 检测条件为: 速灭威包被抗原 HOM - OVA 0.6 $\mu\text{g/ml}$ 在微量分析板中每孔加 50 μl , 速灭威抗血清稀释 20000 倍作为工作浓度, 1%明胶作封闭物, 抗原抗体反应基质 (PBST) 中甲醇含量为 5%、pH 值为 7.4、离子强度为 3.2mol/L, 本方法具有较强的特异性、灵敏性及稳定性, 为速灭威超微量检测提供了快速、灵敏、特异的技术方法。

1、农药速灭威残留量 ELISA 检测方法，包括：

1) 速灭威多克隆抗体制备：

采用速灭威人工抗原的免疫原 β -（间-甲基苯氧甲酰）氨基丙酸-牛血清白蛋白，常规免疫方法免疫新西兰白兔，制备得到抗速灭威的兔多克隆抗体抗血清；

2) 包被：采用速灭威人工抗原的包被抗原 β -（间-甲基苯氧甲酰）氨基丙酸-卵清蛋白 0.6 μ g/ml 在微量分析板中每孔加 50 μ l，4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜，倒净，以常规洗涤缓冲液 PBST 洗涤 3~6 次并倒置、在吸水纸上拍干；

3) 封闭：1%明胶作封闭物，微量分析板每孔加入 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时，倒净，以常规洗涤缓冲液 PBST 洗涤 3~6 次并倒置、在吸水纸上拍干；

4) 加抗体及抗体与待测样品的混合液：

用稀释 10000 倍的速灭威抗血清与待测样品和空白溶液等体积充分混合，以含有 5%甲醇、pH 值为 7.4、离子强度为 3.2mol/L 的 PBST 作为抗原抗体反应的基质，后以每孔 50 μ l 加到微量分析板中，37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时，倒净，以常规洗涤缓冲液 PBST 洗涤 3~6 次并倒置、在吸水纸上拍干；

5) 加酶标二抗：

用 pH7.4、0.15mol/L 的常规洗涤缓冲液 PBST 将商品化的 HRP-羊抗兔 IgG 稀释 2000 倍，微量分析板每孔加 50 μ l，37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时，倒净，以常规洗涤缓冲液 PBST 洗涤 3~6 次并倒置、在吸水纸上拍干；

6) 显色：

TMB 底物溶液 50 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 显色反应 10 分钟

7) 终止反应并读数

加 2mol/L 的硫酸，50 μ l/孔终止显色反应，酶联仪上 450nm 处读出吸光值；空白基质作阳性对照吸光值 B_0 ，待测样品吸光值 B；

8) 数据处理

计算出结合率 B/B_0 及 $\text{Logit} (B/B_0)$ ，

$$\text{Logit} (B/B_0) = \text{Ln} [(B/B_0) / (1-B/B_0)] \quad \text{公式 1}$$

代入如下检测方程：

$$\text{Logit} (B/B_0) = -0.9404 \text{Log} C + 1.5146 \quad \text{公式 2}$$

其中 C 为微量分析板孔中测得的速灭威浓度，通过公式 1 和公式 2 可以求得；

$$X = n \cdot 2C, \quad n \text{ 为反应前样品被稀释的倍数} \quad \text{公式 3}$$

待测样品中以浓度 X 表示的速灭威残留量可通过公式 3 求得。

农药速灭威残留量检测方法

(一) 技术领域

本发明农药速灭威残留量 ELISA 检测方法,属于生物技术领域。专用于农产品和农业生产环境中速灭威(metolcarb)农药残留量的高灵敏度快速检测,特别适用于大批量样品检测和现场监测。

(二) 背景技术

速灭威(metolcarb)属于氨基甲酸酯类化学杀虫剂,是我国大吨位生产的农药品种之一。速灭威制剂毒性中等,主要用于防治棉花、水稻、茶树、柑橘等作物的害虫,具有杀虫谱广、残效长、杀死率高等特点。目前国内许多厂家进行原药或其复配制剂的大规模生产并得到很好的推广。

自20世纪70年代以来,由于有机氯农药受到禁用或限用,以及抗有机磷杀虫剂的昆虫品种日益增多,现在国家已经对一些高毒性如克百威等农药进行禁用,因而速灭威等氨基甲酸酯类农药的用量必然逐年增加,这就使得这类农药残留量的检测倍受关注。速灭威虽然相对已经被禁用的农药来说优点明显,但速灭威的大量使用及其具有的残留期较长、毒性较高等特点,都使得速灭威残留量的检测监控显得十分迫切和必要。

文献报道的对速灭威有效成分检测方法有分光光度法、气相色谱法、高效液相色谱法、薄层层析法等。但只靠这些常规的检测方法已经越来越不能满足农药残留大批量、快速检测工作的需求。

1971年 Ercegovich 等首次用酶联免疫吸附测定(ELISA)法对 DDT 和马拉硫磷进行了残留分析,这是免疫化学技术首次用于农药残留分析。20世纪80年代后,免疫化学分析技术已成为优先研究、开发和利用的农药残留快速检测技术,美国化学学会将免疫分析方法与 GC、HPLC 方法一起列为化学农药残留分析的三大支柱技术,是21世纪最具竞争性和挑战性的超微量检测技术。利用 ELISA(酶联免疫吸附分析)方法不仅可以定性而且可以定量检测样品中的农药残留,这种分析方法对仪器设备要求不高,快速简便,一般无需对样品进行复杂的预处理,灵敏度高,特异性强。而且价格便宜,易于标准化、自动化和适于大容量样本分析等优点。已有文献报道了60多种杀菌剂、杀虫剂、除草剂等的 ELISA 检测方法的建立,其检测水平可达纳克(ng)甚至皮克(pg)。国外一些公司已开发出商品化的农药残留检测试剂盒,如 Immunosystems Inc. 的 Res-I-Mune 试剂盒, NeoGen 公司的 Agriscreen Tickets 试剂盒, Millipore 公司的 EnviroGard 试剂盒, Environmental Diagnostics 公司的 EZ-Screen 试剂盒等。我国在这方面起步较晚,只是90年代后才有越来越多的单位和研究人员重视并从事农药免疫速测技术研究,如刘曙照等已经先后报道了氨基甲酸酯类杀虫剂克百威和甲萘威的免疫检测技术研究等等。

氨基甲酸酯类杀虫剂免疫速测方法国外报道的除了克百威和甲萘威外,1998

年, Antonio Abad 等人制备出了甲硫威(methiocarb)抗原与单克隆抗体并建立甲硫威 ELISA 检测方法;2001年, Maria J. Moreno 等人报道了识别残杀威(propoxur)的单克隆抗体的制备并建立了残杀威 ELISA 检测方法。2003年, 刘凤权、张奇等率先合成了速灭威人工抗原并在中国申报了速灭威人工抗原合成方法的专利, 但速灭威 ELISA 检测方法目前在国内外还未见报道。

(三) 发明内容

技术问题 现有的速灭威检测方法要么操作较复杂、检测费用较高、检测效率低下, 要么检测准确性不高、灵敏度较低、检测极限不足, 本发明的目的是为速灭威农药残留找到一种既快速准确又简单低廉的超微量检测方法。提供速灭威 ELISA 检测方法, 对速灭威农药的残留量进行检测, 准确度高、灵敏度高、检测极限低、简单、快速、低廉。

技术方案

本发明农药速灭威残留量 ELISA 检测方法, 包括:

1) 速灭威多克隆抗体制备:

采用速灭威人工抗原的免疫原 HOM-BSA, 常规免疫方法免疫新西兰白兔, 制备得到抗速灭威的兔多克隆抗体抗血清;

2) 包被: 采用速灭威人工抗原的包被抗原 HOM-OVA 0.6 μ g/ml 在微量分析板中每孔加 50 μ l, 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 倒净, 以常规洗涤缓冲液 PBST 洗涤 3~6 次并倒置、在吸水纸上拍干;

3) 封闭: 1%明胶作封闭物, 微量分析板每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时, 倒净, 以常规洗涤缓冲液 PBST 洗涤 3~6 次并倒置、在吸水纸上拍干;

4) 加抗体及抗体与待测样品的混合液:

用稀释 10000 倍的速灭威抗血清与待测样品和空白抗原抗体反应基质 PBST 液等体积充分混合, 后以每孔 50 μ l 加到微量分析板中, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时, 倒净, 以常规洗涤缓冲液 PBST 洗涤 3~6 次并倒置、在吸水纸上拍干;

5) 加酶标二抗:

用 pH7.4、0.15mol/L 的常规洗涤缓冲液 PBST 将商品化的 HRP-羊抗兔 IgG 稀释 2000 倍, 微量分析板每孔加 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时, 倒净, 以常规洗涤缓冲液 PBST 洗涤 3~6 次并倒置、在吸水纸上拍干;

6) 显色:

TMB 底物溶液 50 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 显色反应 10 分钟

7) 终止反应并读数

加 2mol/L 的硫酸, 50 μ l/孔终止显色反应, 酶联仪上 450nm 处读出吸光值, 空白基质作阳性对照吸光值 B_0 , 待测样品吸光值 B ;

8) 数据处理

计算出结合率 B/B_0 及 $\text{Logit}(B/B_0)$,

$$\text{Logit}(B/B_0) = \ln[(B/B_0) / (1-B/B_0)] \quad \text{公式 1}$$

代入如下检测方程:

$$\text{Logit}(B/B_0) = -0.9404\text{Log}C + 1.5146 \quad \text{公式 2}$$

其中 C 为微量分析板孔中测得的速灭威浓度, 通过公式 1 和公式 2 可以求得:

$$X = n \cdot 2C, \quad n \text{ 为反应前样品被稀释的倍数} \quad \text{公式 3}$$

待测样品中以浓度 X 表示的速灭威残留量可通过公式 3 求得。

上述农药速灭威残留量 ELISA 检测方法中, 抗原抗体反应基质 PBST 中甲醇含量为 5%、pH 值为 7.4、离子强度为 3.2mol/L, 微量分析板中每孔 50 μ l。

有益效果 本发明与现有速灭威检测技术相比, 其优点和积极效果表现在:

(1) **实用性好:** 传统的农药分析主要在实验室进行, 其前处理过程烦琐, 分析速度慢、成本高, 使用的大量有机溶剂易造成环境污染, 且对实验室的仪器化程度和人员素质要求较高, 不能满足农产品贸易对快速、简便、准确、大量检测的需求。而我们提供的速灭威 ELISA 检测方法具有操作简单、快速(以封闭好的微量分析板做检测只需要 2~3 小时即可)、分析成本低、分析容量大、安全可靠等优点, 一般不需贵重仪器, 可大量简化甚至省去前处理过程, 对使用人员的专业技术水平要求不高, 容易普及和推广, 特别适用于大批量样本检测和现场监测。

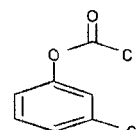
(2) **准确性高:** 与我国目前市场上常用的快速检测方法速测灵、速测卡、速测仪等检测方法相比, 速灭威 ELISA 检测方法准确度较高, 重复性较好(平均变异系数低于 5%), 速灭威抗体特异性识别速灭威农药, 对其他农药几乎不识别。

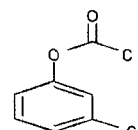
(3) **灵敏性高:** 检测极限远低于其他常规方法, 已经达到 0.013ppb, 可以精确检测到 10^{-9} (1ppb), 远低于国家要求的 10^{-7} (100ppb) 的检测要求。检测曲线的斜率在 1 左右, 较为合理。

(4) **检测范围宽:** 适宜的检测范围为 1~10000ppb

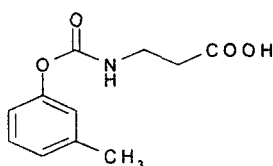
具体实施方式

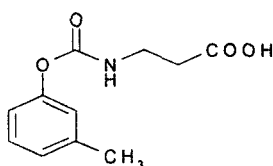
速灭威抗原（免疫原 HOM-BSA 和包被抗原 HOM-OVA）的合成方法为：



1) 间-甲基苯氧甲酰氯(分子式: $C_8H_7O_2Cl$, 结构式: )的合成: 称取双光气 28g, 小心加入 0.135g 活性碳, 36℃水浴加热, 用 51.5g 甲苯收集光气, 甲苯液在 23℃水浴中磁力搅拌, 尾气通入碱液(注意: 光气剧毒, 且气味难闻, 应在通风橱中进行)。至双光气反应完, 甲苯相增重 16.5g, 得 24% 光气/甲苯溶液。称取间-甲基苯酚 7.7g, 溶进 100ml 10%的 NaOH 水溶液, 40℃水浴加热磁力搅拌 1 小时, 冷却到室温后缓慢加入上光气/甲苯溶液, 40 分钟加完, 开始计时, 4 小时后结束反应。取有机相减压蒸馏得 9.012g 黄色油状物。GC 法测定目标物的含量, 5℃冰箱存放备用。

2) β -(间-甲基苯氧甲酰)氨基丙酸(HOM)(分子式: $C_{11}H_{13}O_4N$, 结构



式: )的合成: 称取间-甲基苯氧甲酰氯 3.275g(约 12.1mmol),

溶进 4 ml 4M NaOH 溶液, 置 5℃冰箱冷却, 得 A 液; 称取 β -丙氨酸 1.989g(约 22.3mmol), 溶进 4ml 4M NaOH 溶液, 置 5℃冰箱冷却, 得 B 液; 另取 3 ml 4M NaOH 溶液, 置 5℃冰箱冷却, 得 C 液。将 A 液与 C 液均分成 5 等份, 每间隔 5~10 分钟向 B 液中同时各加入 1 份, 整个反应置冰水中, 磁力搅拌下进行。加样全部完成开始记时, 2 小时后结束反应。用浓盐酸调节反应终液的 pH 值为 4, 目标产物用乙酸乙酯(3 个 50ml 份)抽提; 乙酸乙酯相用稀 HCl 洗涤数次, 用 1M NaHCO₃ 溶液(2 个 50ml 份)抽提; 水相再用浓盐酸酸化, 乙酸乙酯再抽提; 无水 Na₂SO₄ 干燥, 所得物减压蒸馏浓缩至 13.8ml, 向浓缩液中逐渐加入 31ml 正己烷, 白色结晶物析出, 过滤。结晶物经低温干燥得 3.898g; 再经过甲苯与去离子水 5℃下洗涤, 低温干燥后称重得到 H_速较纯品 1.871g, 回收率为 48%。

3) 速灭威人工抗原(HOM-OVA、HOM-BSA)的合成: 称取 H_速 结晶物 223mg 和 NHS 130mg, 用 1000 μ l DMF 溶解于反应装置中; 称取 300mg DCC, 用 500 μ l DMF 溶解; 将 DCC/DMF 溶液滴加到上反应装置中。反应在磁力搅拌下室内温度进行 7 小时(过夜)。反应终液置 5℃冰箱冷却 2 小时以上, 经 1.2 万 rpm 离心 5 分钟, 取上清活泼酯液并将其均分为 2 等份, 分别缓慢滴加到 2.5ml 12mg/ml 的 BSA 溶液与 2.5ml 12mg/ml 的 OVA 溶液中反应, 反应缓冲液为 0.2M pH8.0 的 PB 液。反应在磁力搅拌下室内温度进行 4 小时(从加样结束开始记时)。将反应液置透析袋内, 于 0.2M pH6.8 的 PB 中 4℃搅拌透析, 每 4 小时换一次透析液, 共透析 60 小时。透析结束后将透析袋中的白色乳状液装于若干 1ml 离心管中, 于 -20℃冰箱中存放备用。所合成的速灭威人工抗原(HOM-OVA、HOM-BSA)保存期限为 3 年。

实施例 1 河水样品中检测速灭威残留量

速灭威 ELISA 反应体系主要条件

HOM-OVA 包被物 0.6 μ g/ml 在微量分析板中每孔加 50 μ l, 速灭威抗血清稀释 20000 倍作为工作浓度, 1%明胶作封闭物, 抗原抗体反应基质(PBST)中甲

醇含量为 5%、pH 值为 7.4、离子强度为 3.2mol/L，微量分析板中每孔 50 μ l。

待测样品准备：

河水样品：量取河水 1L，加入速灭威净重 50 μ g，配制成 50ppb 的液体样品。

采用速灭威 ELISA 检测方法对以上样品进行检测，操作如下：

1) 包被：

HOM-OVA 作为包被物，0.6 μ g/ml 在微量分析板中每孔加 50 μ l，4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜，倒净，以常规洗涤缓冲液 PBST 洗涤 3~6 次并倒置、在吸水纸上拍干；

2) 封闭：

1%明胶作封闭物，微量分析板每孔 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时，倒净，以常规洗涤缓冲液 PBST 洗涤 3~6 次并倒置、在吸水纸上拍干；

3) 加抗体及抗体与待测样品的混合液：

取待测样品 200 μ l 加到 800 μ l 反应基质中配制成待测液，稀释 10000 倍的速灭威抗血清与待测液和空白基质液等体积充分混合，后以每孔 50 μ l 加到微量分析板中，37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时，倒净，以常规洗涤缓冲液 PBST 洗涤 3~6 次并倒置、在吸水纸上拍干；

4) 加酶标二抗：

用 pH7.4、0.15mol/L 的 PBST 缓冲液液将商品化的 HRP-羊抗兔 IgG 稀释 2000 倍，微量分析板每孔加 50 μ l，37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时，倒净，以常规洗涤缓冲液 PBST 洗涤 3~6 次并倒置、在吸水纸上拍干。

5) 显色：

TMB 底物溶液 50 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 显色反应 10 分钟

6) 终止反应并读数

加 2mol/L 的硫酸，50 μ l/孔终止显色反应，酶联仪上 450nm 处读出吸光值，空白基质作阳性对照， $B_0=0.798$ ，待测样品吸光值 $B=0.561$ 。

7) 数据处理

计算出结合率 $B/B_0=70.3\%$ ，代入公式 1

$$\text{Logit}(B/B_0) = \ln[(B/B_0) / (1-B/B_0)] \quad \text{公式 1}$$

得到 $\text{Logit}(B/B_0) = 0.861$

代入如下检测方程：

$$\text{Logit}(B/B_0) = -0.9404\text{Log}C + 1.5146 \quad \text{公式 2}$$

其中 C 为微量分析板孔中测得的速灭威浓度，求得 $C=4.95\text{ppb}$ 。待测样品中速灭威残留量（以浓度 X 表示）可通过公式 3 求得：

$$X = 5 \times 2C \quad \text{公式 3}$$

求得待测样本浓度 $X=49.5\text{ppb}$ ，结果与实际浓度相当。

实施例 2 土壤样品中检测速灭威残留量

速灭威 ELISA 反应体系主要条件同实施例 1。

待测样品准备：

土壤样品：称取 1kg 田间自然土壤，加入速灭威净重 500 μ g，配制成 500ppb 的固体样品。

采用速灭威 ELISA 检测方法对以上样品进行检测，操作如下：

步骤 1)、2) 同实施例 1。

3) 加抗体及抗体与待测样品的混合液：

称取待测样品 0.1g，用 0.2ml 甲醇浸泡 1 小时左右，取 100 μ l 加到 900 μ l 反应基质中配制成待测液，稀释 10000 倍的速灭威抗血清与待测液和空白基质液等体积充分混合，后以每孔 50 μ l 加到微量分析板中，37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时，倒净，以常规洗涤缓冲液 PBST 洗涤 3~6 次并倒置、在吸水纸上拍干；

步骤 4)、5)、6) 同实施例 1；

7) 数据处理

计算出结合率 $B/B_0=63.0\%$ ，代入公式 1：

$$\text{Logit}(B/B_0) = \ln[(B/B_0) / (1-B/B_0)] \quad \text{公式 1}$$

得到 $\text{Logit}(B/B_0) = 0.533$

代入如下检测方程：

$$\text{Logit}(B/B_0) = -0.9404\text{Log}C + 1.5146 \quad \text{公式 2}$$

其中 C 为微量分析板孔中测得的速灭威浓度，求得 $C=11.05\text{ppb}$ 。待测样品中速灭威残留量（以浓度 X 表示）可通过公式 3 求得：

$$X = 20 \times 2C \quad \text{公式 3}$$

求得待测样本浓度 $X=442\text{ppb}$ ，与实际浓度基本接近。

专利名称(译)	农药速灭威残留量检测方法		
公开(公告)号	CN1312478C	公开(公告)日	2007-04-25
申请号	CN200410065318.4	申请日	2004-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
[标]发明人	刘凤权 胡白石 张奇 徐丽娜 姜英华		
发明人	刘凤权 胡白石 张奇 徐丽娜 姜英华		
IPC分类号	G01N33/547 G01N33/543 G01N33/535 G01N33/52 G01N21/31		
其他公开文献	CN1609618A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明速灭威(metolcarb)ELISA检测方法属于农药残留分析及农产品安全检测范畴。检测方程为 $\text{Logit}(B/B_0) = -0.9404\text{Log}C + 1.5146$ (其中B为样品孔吸光值, B_0 为阳性对照吸光值, C为板孔中测出的速灭威浓度), 检测条件为: 速灭威包被抗原HOM-OVA 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 在微量分析板中每孔加50 μl , 速灭威抗血清稀释20000倍作为工作浓度, 1%明胶作封闭物, 抗原抗体反应基质(PBST)中甲醇含量为5%、pH值为7.4、离子强度为3.2 mol/L, 本方法具有较强的特异性、灵敏性及稳定性, 为速灭威超微量检测提供了快速、灵敏、特异的技术方法。