

基于广谱性单克隆抗体免疫分析有机磷农药残留

王 菡^{1*}, 李高华¹, 陈 涛², 薛小平², 张 阳²

(1. 陕西出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 西安 710068; 2. 西安立邦制药有限公司, 西安 710077)

摘要: **目的** 制备和筛选出一种能识别一类或几类具有结构相似的有机磷杀虫剂的广谱性鼠单克隆抗体(mAb)以对多农药残留同时进行检测。**方法** 制备抗有机磷组特异性单克隆抗体, 利用间接竞争性ELISA法对几种有机磷农药的标准品进行检测。**结果** 对乙基毒死蜱检测灵敏度较高, 最低检测限(LOD)为4 ng/mL, 对甲基对硫磷的LOD为63 ng/mL; 辛硫磷和三唑磷的检测敏感度低、一致性差。**结论** 根据农药化学结构的不同, 检测灵敏度有一定的差别, 对乙基毒死蜱和甲基对硫磷检测效果较好。

关键词: 有机磷农药; 多种残留检测; 单克隆抗体; 酶免疫检测法

Immunoassay for multiple residues of organophosphorus pesticides using broad spectrum of monoclonal antibodies

WANG Han^{1*}, LI Gao-Hua¹, CHEN Tao², XUE Xiao-ping², ZHANG Yang²

(1. *The Inspection and Quarantine Technology Center of Shaanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xi'an 710068, China*; 2. *Xi'an Libang Pharmaceutical Co., Ltd., Xi'an 710077, China*)

ABSTRACT: Objective To prepare and screen a broad spectrum of monoclonal antibodies (mAb), which can identify a class of organophosphorus pesticide with similar structures for the simultaneous detection of multiple pesticide residues. **Methods** Monoclonal antibodies against organophosphorus pesticide were prepared. Several standard of organophosphorus pesticide were detected by indirect competitive ELISA. **Results** The limit of detecting (LOD) value of chlorpyrifos-ethyl was 4 ng/mL with high sensitivity. The LOD value for parathion-methyl was 63 ng/mL. The sensitivity of the detection of the phoxim and phentriazophos was low. **Conclusion** The sensitivity of detection was distinguished because of the difference of chemical structure. The detection effect of chlorpyrifos-ethyl and parathion-methyl was good.

KEY WORDS: organophosphorus pesticide; multi-residue detection; monoclonal antibody; enzyme immunoassays

1 引言

近几十年来, 有机磷农药(organophosphorus pesticide, OPs)在农业及畜牧业中得到广泛应用。目前, 对有机磷农药的检测, 主要采用色谱方法, 包括: 薄

层色谱法、气相色谱法和高效液相色谱法^[1-4]。这些传统的方法具有灵敏可靠的优点, 但是它们也存在一些明显的不足: 成本高、劳动强度大、样品准备程序复杂, 并且不利于现场操作。因此, 迫切需要建立一种简单、快速、灵敏、价廉, 并能够适用在实验室

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2013IK179)

Fund: Supported by the Science and Technology Planning Project of General Administration of Quality Supervision and Quarantine of the People's Republic of China (2013IK179)

*通讯作者: 王菡, 硕士, 工程师, 主要从事食品安全检测技术研究。E-mail: wanghan128@126.com

*Corresponding author: WANG Han, Master, The Inspection and Quarantine Technology Center of Shaanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xi'an 710068 China. E-mail: Shaanxighl@sina.com

和现场进行大批量的检测和筛选试验的检测技术。免疫检测法是基于抗原抗体特异性识别和结合反应的是一类新的快速、敏感、简便的检测方法,能够满足以上要求,从而逐渐受到人们的重视。

传统的农药残留免疫检测技术只针对某一种特定的农药残留进行分析。本文基于实际应用中常常采取多种农药混合搭配使用的特点,选择毒死蜱、甲基对硫磷、辛硫磷、三唑磷这4种高毒高残留的有机磷农药。根据其共有的化学结构,合成与原药母体结构密切相关的类似物作为通用性半抗原,将通用性半抗原与载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)偶联,分别合成免疫原和检测抗原,以此制备、筛选出一种能识别一类或几类具有结构相似的有机磷杀虫剂的广谱性鼠单克隆抗体(mAb),以此达到对这4种农药残留同时检测的目的。

2 材料与amp;方法

2.1 材料、试剂和仪器

2.1.1 试剂

4-羟基-2-甲基苯甲酸	Sigma
二乙基-氯-硫代磷酸盐	山东临沂农药厂惠赠
牛血清白蛋白(BSA)	Roche
卵清蛋白(OVA)	Roche
二环己基碳二亚胺(DCC)	Sigma
N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)	Sigma
三正丁胺	Sigma
氯甲酸异丁酯	西安化学试剂厂
二甲基甲酰胺(DMF)	西安化学试剂厂
弗氏完全佐剂	Sigma
乙基毒死蜱	西安交通大学医学院环境与劳动卫生教研室惠赠
辛硫磷	西安交通大学医学院环境与劳动卫生教研室惠赠
三唑磷	西安交通大学医学院环境与劳动卫生教研室惠赠
甲基对硫磷	西北农林科技大学农药研究中心惠赠
甲醇	西安化学试剂厂
柠檬酸三钠	西安化学试剂厂

2.1.2 免疫动物

八周龄雌性 BALB/c 小鼠(购于第四军医大学实验动物中心)

2.1.3 仪器

酶标仪	680 型	美国 Bio-Rad
紫外分光光度计	U-3310	日本 HITACHI
超纯水机	Milli-Q	美国密理博
冻干机	1-2/LD-2	德国 ALPHA
电转移系统	mini trans-blot	美国 Bio-Rad
电泳系统	mini protean system 3	美国 Bio-Rad
荧光分光光度计	F-4500	日本 HITACHI

2.2 抗原合成与单克隆抗体的制备

2.2.1 半抗原合成

如图1所示,1.35 g 4-羟基-2-甲基苯甲酸溶于硫酸/甲醇(1:10)中,逆流24 h,蒸发,残余过柱层析(硅胶,己烷:乙酸乙酯=2:1 TLC Rf 0.54)。将上述产物(1)0.26 g溶于3 mL 丁酮,加入0.5 g 二乙基-氯-硫代磷酸盐,以及5 g 精细研磨的碳酸钾,混合物在80 °C 搅拌24 h,然后硅藻土过滤。滤液浓缩,上柱层析(硅胶,己烷:乙酸乙酯=5:1 TLC Rf 0.48)。再将产物(2)318 mg溶于60 mL 乙醇,电磁搅拌下加入25 mL 的1 mol/L KOH,室温下继续搅拌30 min;加入30 mL 的1 mol/L HCl,50 mL 乙酸乙酯萃取,20 mL 的1 mol/L HCl 洗涤有机层,无水硫酸镁干燥,待溶剂蒸发干净后,残余上柱层析(硅胶,己烷:乙酸乙酯:乙酸=200:100:8, TLC Rf 0.57)。得到70 mg 半抗原(Hapten)。

2.2.2 人工免疫原及检测抗原的制备与鉴定

(1) 混合酸酐法制备人工抗原

取 O,O-二乙基 O-(4-羟基-3-甲基苯)磷硫酰 9.5 mg、三正丁胺 7.3 μL 及氯甲酸异丁酯 4 μL,溶于0.5 mL 的 DMF(分子筛脱水)中,常温下避光搅拌40 min。将上述反应液于电磁搅拌下逐滴滴加到3.5 mL 溶有40.5 mg BSA 或37 mg OVA 的超纯水中(含10% 体积 DMF),室温下搅拌2 h。用1 mol/L NaOH 调 pH 至8.5,室温搅拌3 h。4 °C 下对2 L 超纯水透析两天,冻干。其中 Hapten 与 BSA 的偶联物(Hapten-BSA)为人工免疫原, Hapten 与 OVA 的偶联物(Hapten-OVA)为人工检测抗原。

(2) 活化酯法制备人工抗原

取9.5 mg O,O-二乙基 O-(4-羟基-3-甲基苯)磷硫酰及6.3 mg 二环己基碳二亚胺(DCC)溶于0.5 mL

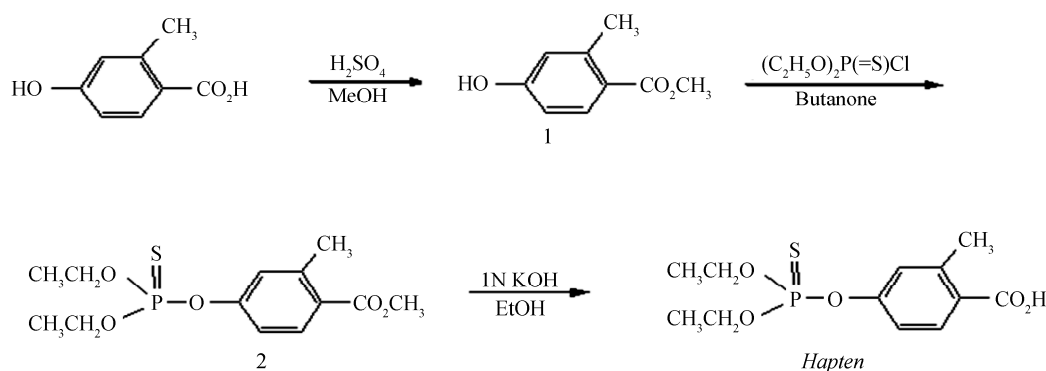


图 1 半抗原的合成

Fig. 1 Synthetic route for hapten

DMF(分子筛脱水)中, 常温下避光搅拌 10 min, 加入 3.53 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS), 继续避光搅拌 3.5 h。离心后, 将上清液在电磁搅拌条件下, 逐滴滴加到溶有 40.5 mg BSA 或 37 mg OVA 的 4 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH8.0)中, 常温下继续搅拌 2 h, 4 °C 下对 2 L 超纯水透析两天, 冻干。其中 Hapten-BSA 为人工免疫原, Hapten-OVA 为人工检测抗原。

(3) 紫外吸收光谱对偶联物进行分析

用 PBS 溶解 BSA、OVA、Hapten-BSA 及 Hapten-OVA, 浓度为 0.2 mg/mL。用 DMF 溶解 Hapten, 浓度为 0.2 mg/mL。将上述溶液置于 U-3310 紫外分光光度计中进行波长扫描, 扫描波长 200~300 nm, 光程 10 mm。对上述 0.2 mg/mL 的 Hapten 做系列稀释, 于波长扫描最大吸收峰处测定吸光度值, 绘制吸光度值-浓度标准曲线, 并利用此标准曲线分别测定 Hapten-BSA 及 Hapten-OVA 中 Hapten 和载体蛋白的量, 计算出分子偶联比。

(4) 人工抗原免疫原性鉴定

用人工免疫原对 8 周龄 BALB/c 小鼠进行免疫, 每种免疫原免疫 3 只小鼠。初次免疫按每只 BALB/c 小鼠 100 μg Hapten-BSA(溶于 100 μL PBS)以 1:1(V:V)的比例加入福氏完全佐剂, 充分混合制成乳液, 分多点注射于 BALB/c 小鼠颈背部皮下。以后间隔两周追加免疫一次, 方法为腹腔注射 100 μg Hapten-BSA(溶于 100 μL PBS, 不加福氏佐剂), 共追加免疫 5 次。每次免疫后一周断尾采血, 分离血清。采用非竞争性间接 ELISA 法测定多克隆抗体的效价。

2.2.3 杂交瘤细胞株及单克隆抗体的制备与鉴定

(1) 杂交瘤细胞株及单克隆抗体的制备

单克隆抗体的制备: Hapten-KLH (50 mg 溶于 100 μL PBS) 以 1:1(V:V)的比例加入福氏完全佐剂, 制备乳液 200 μL , 皮下多点注射免疫 BALB/c 小鼠, 间隔两周, 腹腔注射免疫原 50 $\mu\text{g}/100$ μL PBS, 追加免疫 2 次, 末次免疫后 3 d, 取小鼠脾细胞做细胞融合。SP2/0 细胞(2×10^7)与免疫鼠脾细胞(1×10^8)按 1:5 的比例混合^[1], 加入 PEG-1500 融合, 操作按 PEG 使用说明进行。融合细胞滴种于 96 孔培养板, 在 HAT 培养基中选择培养, 3 d 后半量换液一次, 5 d 左右有细胞克隆形成, 取培养上清用 ELISA 间接法和 ELISA 竞争抑制法检测单克隆抗体(mAb)滴度和抗体特异性。取抗体分泌阳性细胞, 用有限稀释法做克隆化^[1], 以获得可稳定分泌特异性 mAb 的单克隆杂交瘤细胞系。扩大培养筛选出的单克隆株, 使用 BALB/c 小鼠体内诱生腹水的方法大量制备单克隆抗体^[2,3]。使用辛酸-硫酸铵法纯化单克隆抗体, SDS-PAGE 鉴定。

(2) 单克隆抗体亚型及效价测定

单克隆抗体亚型鉴定采用间接 ELISA 法, 检测试剂盒(Sigma Co.USA), 操作按使用说明进行。抗体效价及参考工作浓度测定采用非竞争性间接 ELISA 法。

(3) 单克隆抗体特异性鉴定

采用 Western 免疫印迹法对单克隆抗体特异性进行鉴定。分别将 BSA 及两种方法制备的人工免疫原各 10 μL (1 mg/mL)与等体积的 Loading

buffer 混合后上样, 积层胶使用 100 V 电压, 分离胶 120 V 电压。电泳结束后, 考马斯亮蓝 R-250 染色 1 h, 脱色液脱色后使用凝胶成像系统对凝胶进行成像记录。

(4) 单克隆抗体亲和力测定

非竞争酶免疫法测定抗体亲和力。单抗经纯化后冻干, 以样品缓冲液溶解, 稀释制成 11 种浓度: 4、2、1、0.5、0.25、0.13、0.06、0.03、0.02、0.01、0 $\mu\text{g/mL}$ 。检测抗原以 20 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 和 5 $\mu\text{g/mL}$ 三个水平分别包被 ELISA 板条。系列稀释的抗体加至不同包被量的反应孔中; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 反应, TMB 显色, 测 450 nm 吸光值。根据抗原抗体结合的 S 形曲线, 求解不同抗原浓度下半数吸光值的抗体浓度。

2.3 竞争性酶联免疫吸附实验

2.3.1 抗体、抗原最佳工作浓度选择

用方阵法对间接竞争法中抗原抗体最适工作浓度进行选择, 以 0.185 mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液为包被介质将 Hapten-BSA 梯度稀释, 包被固相载体, 每一种包被浓度均与不同浓度的抗体进行结合反应, 酶标二抗均为 1:5000 稀释。以酶标仪读取各孔 OD_{450} 值, 当值为 1.0 时, 抗原抗体用量较少, 此时抗原抗体的浓度即为工作浓度。

2.3.2 间接竞争 ELISA 检测方法标准曲线的建立

根据方阵滴定结果分别对抗原抗体最佳工作浓度确定后, 将四种有机磷农药的甲醇溶液 100 mg/mL, 以样品缓冲液分别稀释为 10000、1000、100、10、1、

0.1、0.01、0.001、0.0001、0 $\mu\text{g/mL}$, 通过非竞争性间接 ELISA 法检测测定。将系列稀释后的农药加入封闭好的酶标板中, 50 $\mu\text{L/孔}$ 。再加入以稀释液稀释的抗体, 50 $\mu\text{L/孔}$ 。以后步骤同上。将测定值换算为 $B/B_0 \times 100\%$, 并以其为纵坐标, 样品浓度的对数为横坐标, 绘制标准抑制曲线, 使用 SPSS13.0 进行 Logistic 分析。

2.3.3 样品添加回收率测定

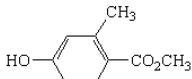
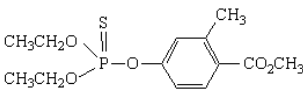
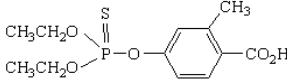
选择苹果、猕猴桃、红豆、玉米、葱、蒜、土壤和自来水等九种样品对毒死蜱进行添加回收实验, 设定两个添加水平: 0.1 mg/kg 和 1 mg/kg, 另设空白样品, 每个水平重复测定三次。对苹果、猕猴桃、红豆、玉米、葱、蒜、土壤等样品采用同样的萃取方法: 瓜果以纯水清洗并切碎, 以 1 g/份添加毒死蜱, 以 5 mL 甲醇萃取 1 h, 土壤以同样的方法加样、萃取。提取液经脱脂棉过滤后, 以样品缓冲液 10 倍稀释后, 间接竞争 ELISA 检测, 结果代入 Logistic 曲线计算回收率。空白以上述方法制备, 但不添加农药。自来水样直接加入毒死蜱进行测定。

3 结果与分析

3.1 半抗原合成

由 4-羟基-2-甲基苯甲酸 1.35 g 及二乙基-氯-硫代磷酸盐 0.5 g 两种原料最终可以得到 70 mg O,O-Diethyl O-(4-carboxy-3-methylphenyl) phosphorothioate (Hapten), 产率为 23%。中间产物产量及产率见下表 1

表 1 半抗原及中间产物的产量及产率
Table 1 Yield of Hapten and intermediate product

产物	结构	产量(g)	产率(%)
Methyl 4-hydroxy-2-methylbenzoate		1.16	79
O,O-Diethyl O-[3-methyl-4-(methyloxycarbonyl)phenyl]phosphorothioate		0.362	72
O,O-Diethyl O-(4-carboxy-3-methylphenyl)phosphorothioate (Hapten A)		0.07	23

3.2 人工免疫原及检测抗原的制备及鉴定

3.2.1 完全抗原的制备

以混合酸酐制备人工免疫原 (Hapten-BSA) 32.5 mg, 产率为 65%, 人工检测抗原(Hapten-OVA) 32.3 mg, 产率为 64.6%; 以活化酯法制备人工免疫原 (Hapten-BSA) 28.5 mg, 产率为 57%, 人工检测抗原 (hapten-OVA) 33.8 mg, 产率为 67.6%。从实验数据及结果分析中可以看出两种方法制备人工抗原的产率无统计学意义的差别。

3.2.2 紫外吸收光谱

根据紫外扫描结果, 半抗原与 BSA、OVA 的偶联物与载体蛋白的吸收峰相比, 发生了明显的变化, 表明半抗原被成功地偶联到载体蛋白上, 结果见图 2。

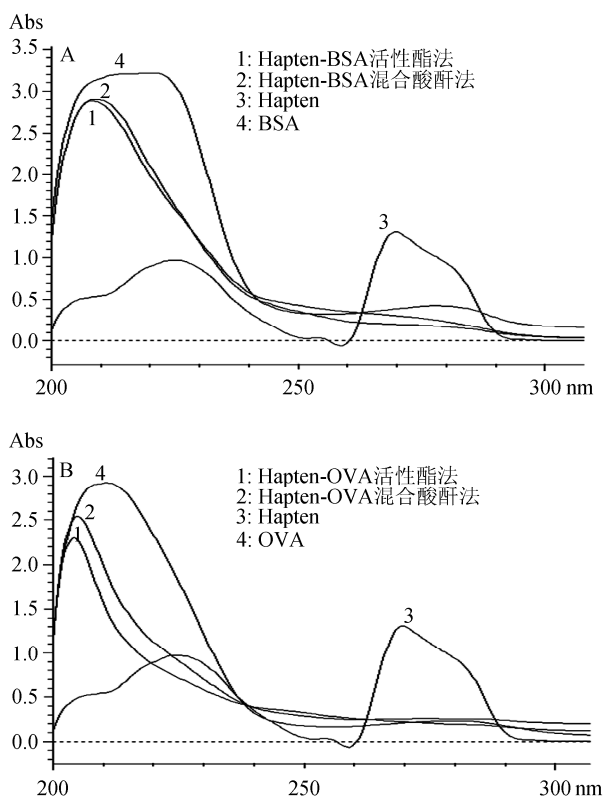


图 2 半抗原与偶联物及载体蛋白的紫外扫描图谱

Fig. 2 UV-Vis spectrum of Hapten, conjugate and carriers

图 2A 为 Hapten、BSA 及 Hapten-BSA 的紫外吸收光谱, 各溶液的浓度均为 0.2 mg/mL。其中, Hapten 呈现两个强度相似的吸收峰, 分别为 268 nm 和 225

nm; BSA 在 220 nm 有一较大的吸收峰(肽键吸收峰), 在 280 nm 处有一较小的吸收峰(芳香族氨基酸吸收峰)。因此, 在 268 nm 吸收峰处测定 Hapten-BSA 吸光度值, 较少受到 BSA 的影响, 可用来计算其中 Hapten 的含量。如图 3 所示在 268 nm 波长处建立 Hapten 标准曲线: $Y = -7.625 + 166.69X$, $r^2 = 0.99$, 浓度范围 0.75 $\mu\text{g/mL}$ ~200 $\mu\text{g/mL}$ 。而要在 210~220 nm 吸收峰处测定 Hapten-BSA 和 Hapten-OVA 的吸光度值, 以此来计算其中 BSA 和 OVA 的含量则受到 Hapten 吸收峰的影响。由于这两种蛋白都无法透过透析袋, 可以假设经充分透析后, 除去未偶联的 Hapten 及其他偶联试剂, 透析袋内只有 Hapten-BSA 或 Hapten-OVA 溶液, 即从总量中减去测得的 Hapten 量即可得到蛋白质的量。

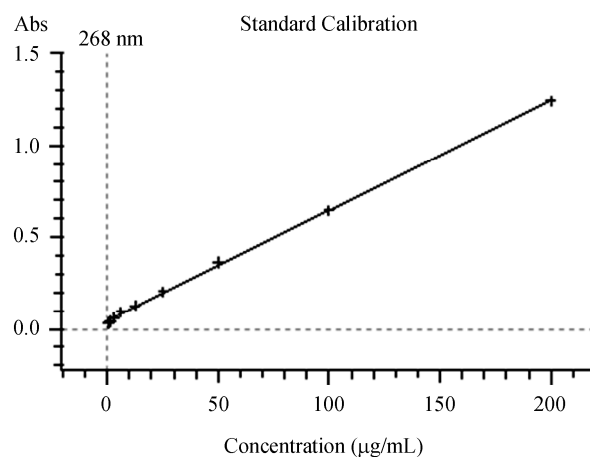


图 3 Hapten 的标准曲线

Fig. 3 Standard curve of hapten

在 268 nm 波长处测定人工免疫原和人工检测抗原的吸光度值(各 200 $\mu\text{g/mL}$), 并由图 3 中标准曲线计算得到各自所含的载体蛋白和 Hapten 的量, 从而计算出 Hapten 对载体蛋白的分子偶联比, 结果见表 2; 可以看出, 活泼酯法的偶联比高于混合酸酐法; 并且无论哪种方法, 以 BSA 为载体蛋白的抗原表位密度均高于以 OVA 的偶联抗原。检索这两种蛋白的氨基酸序列可知 BSA 所含的游离氨基数远高于 OVA。

3.2.3 人工抗原免疫原性鉴定

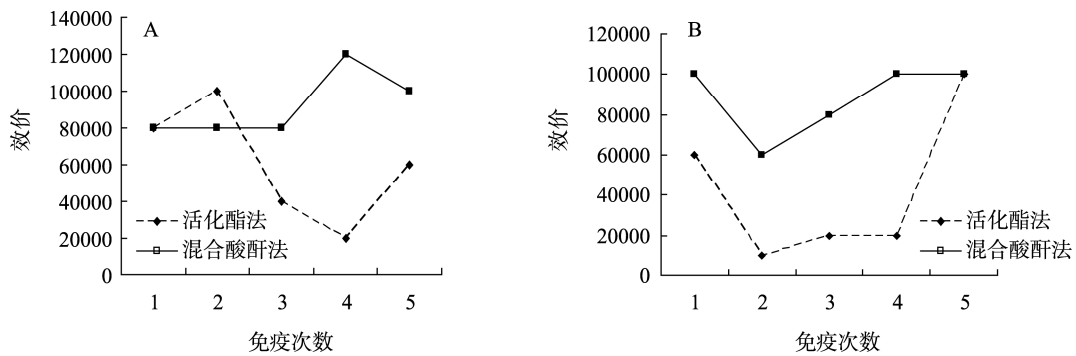
以上述两种方法制备的人工免疫原各免疫三只

BALB/c 小鼠, 每次加强免疫后一周尾静脉采血, 分离血清。结果如图 4 显示, 用混合酸酐法制备的免疫原免疫效果较好, 两次免疫后小鼠血清抗体效价即可达到 1:60,000~120,000, 且第二次加强后抗体滴度增长较为平稳。而活化酯法制备的人工免疫原免疫 BALB/c

小鼠后, 血清抗体效价为 20000~100000, 且随着加强免疫次数的增加出现较大波动。将抗血清 1:20000 稀释, 使用两种方法制备的 Hapten-OVA 分别包被进行间接 ELISA, 得到的 450 nm OD 值见图 5, 可以看出两种抗原的抗体结合活性无显著性差别。

表 2 人工抗原分子偶联比(Hapten: 载体蛋白)
Table 2 Molecul ratio of antigens

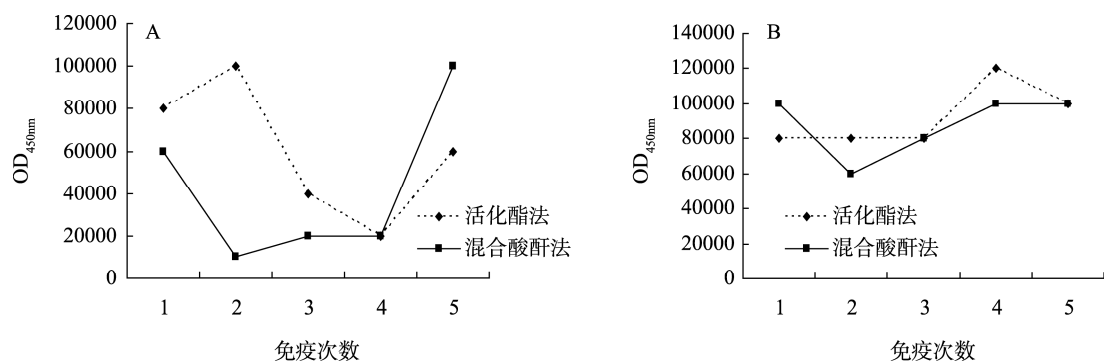
人工抗原	制备方法	BSA($\mu\text{g/mL}$)	OVA($\mu\text{g/mL}$)	hapten($\mu\text{g/mL}$)	分子偶联比
Hapten-BSA	混合酸酐法	173	—	27	33:1
	活化酯法	165	—	35	45:1
Hapten-OVA	混合酸酐法	—	181	19	16:1
	活化酯法	—	175	25	22:1



A: 检测抗原为活化酯法制备, B: 检测抗原为混合酸酐法制备

图 4 抗 Hapten-BSA 多克隆抗体效价随加强免疫次数的变化

Fig. 4 The change of anti-Hapten-BSA polyclonal antibody titer with the times of strengthening immunity



A: 免疫原为活化酯法制备, B: 免疫原为混合酸酐法制备

图 5 两种方法制备的包被抗原 OD 值变化

Fig. 5 The change of OD vaule of envelope antigen by two methods

3.3 单克隆抗体的纯化与鉴定

3.3.1 单克隆抗体的制备与纯化

杂交瘤细胞悬液接种小鼠腹腔, 诱导产生腹水, 小鼠腹水经辛酸 - 硫酸铵法提取后, SDS - PAGE 检测, 抗体纯度达到 90%以上, 分子量为 160 kDa, 见图 6。



图 6 mAb 的 SDS-PAGE 电泳结果
Fig. 6 SDS-PAGE electrophoresis of mAb

3.3.2 单克隆抗体的鉴定

(1) Ig 亚类测定: 经 Ig 亚类试纸鉴定, 所制备的 mAb 为 IgG1, κ 轻链。

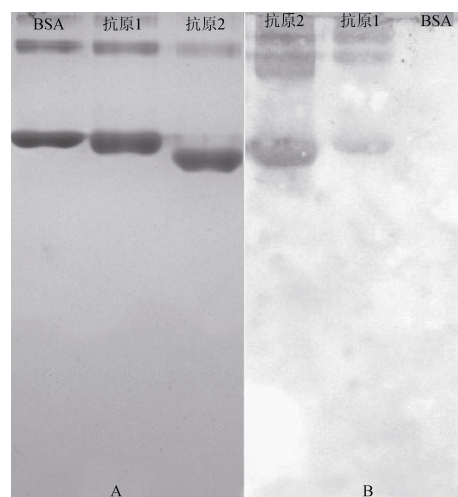
(2) 腹水抗体效价测定: 间接 ELISA 法检测, 腹水抗体效价为 1×10^6 。

(3) mAb 特异性测定

图 7A 为非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果, 同样的 Hapten 和载体蛋白, 因使用的偶联剂和偶联活性基团的不同, 不仅产物的偶联率不同, 而且产物的荷电情况及分子量也不完全一致, 如图所示, 抗原 2 与抗原 1 和 BSA 相比较, 条带位置有明显的差别。图 7B 为 Western blot 显色结果, 如图所示, mAb 与两种偶联物——抗原 1 和抗原 2, 均产生明显的染色条带, 表明 mAb - 偶联物间有很强的结合反应, 而未偶联 Hapten 的 BSA 处则无条带显出, 表明该单克隆抗体对 BSA 并无交叉反应。

(4) mAb 亲和力测定:

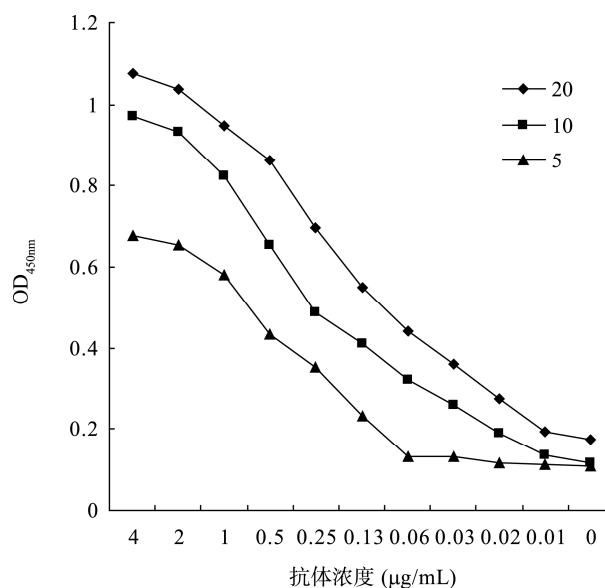
以非竞争性 ELISA 对初步纯化后的单克隆抗体做亲和力常数的测定。经非竞争性 ELISA 法检测, 单克隆抗体的亲和常数 (M^{-1}) 为 6.43×10^8 , 图 8 是对不同浓度包被的检测抗原 Hapten-BSA 结合的反应曲线。



A: 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, B: Western blotting;
抗原 1: 活化酯法制备的 Hapten-BSA, 抗原 2: 混合酸酐法制备的 Hapten-BSA

图 7 使用抗 Hapten-BSA 的单克隆抗体对 Hapten-BSA 以及 BSA 进行 Western blotting 分析

Fig. 7 Western immunoblotting of analysis of Hapten-BSA and BSA using the monoclonal antibody



Hapten-BSA coating concentrations Hapten-OVA 的包被浓度分别为: 20 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 和 5 $\mu\text{g/mL}$

图 8 单克隆抗体对 Hapten 的 ELISA 反应曲线

Fig. 8 Experimental ELISA curve for mAb with different

3.4 抗体、检测抗原最佳工作浓度

经方阵实验, 间接 ELISA 中以 Hapten-BSA 为包被原, 最佳工作浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$, 含单克隆抗体的小鼠腹水工作稀释度为 1.6×10^4 (表 3)。

表3 包被抗原与抗体不同稀释度组合的 OD_{450nm} 值
Table 3 OD_{450nm} of different antibody and antigen concentrations

抗体稀释倍数	包被抗原(Hapten-BSA)浓度(μg/mL)		
	100	10	0.5
8000	1.908	1.431	0.845
12000	1.904	1.221	0.481
16000	1.404	1.051	0.239
20000	0.910	0.776	0.182

3.5 间接竞争 ELISA 检测方法标准曲线的建立

将四种农药纯品做系列稀释, 使用间接竞争性 ELISA 法得到竞争抑制曲线(图 9)。利用 logistic 拟合曲线模型对图中数据进行分析, 毒死蜱的 logistic 曲线为: $Y=92.126/(1+e^{1.561+1.549t})$; 甲基对硫磷的 logistic 曲线为: $Y=99.979/(1+e^{-0.504+0.938t})$; 辛硫磷的 logistic 曲线为: $Y=98.552/(1+e^{-2.665+1.641t})$; 三唑磷的 logistic 曲线为: $Y=88.983/(1+e^{-3.590+1.682t})$, 拟合系数 $r^2>0.96$, 由此得到四种农药的 50%抑制浓度(IC₅₀)及最低检测限(LOD), 见表 4。

3.6 样品添加回收率

表 5 为对人工模拟污染标本的检测结果, 从表中统计的检测结果中可见, 土壤和自来水添加毒死蜱

后的提取物中, 基质效应较弱些, 而葱和蒜的基质干扰较大。对添加量为 0.1 mg/kg 的被检样品, 回收率的平均值在 88%~94%之间; 对于添加量为 1 mg/kg 的被检样品, 回收率平均值在 60%~82%之间, 可能因为 0.1mg/kg 添加量毒死蜱在提取液中的浓度恰好落在竞争抑制曲线的线性范围内, 而 1 mg/kg 添加量的提取液浓度超出了线性范围内, 故有较大偏差。未添加毒死蜱的样品均不出现假阳性。

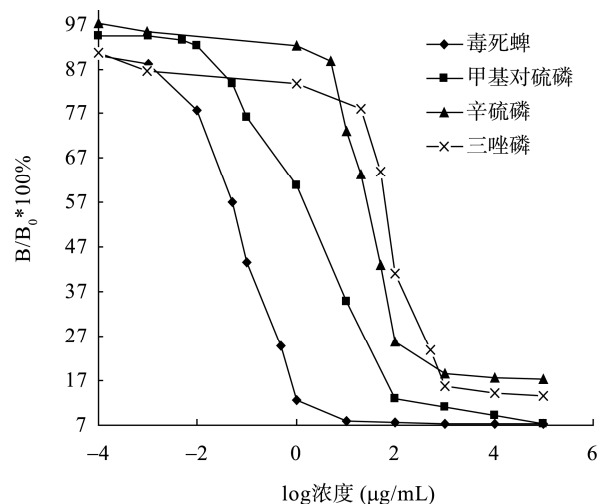


图 9 有机磷农药竞争抑制曲线

Fig. 9 Dose-response curve for the pesticides

表 4 四种有机磷农药的 IC₅₀ 及 LOD (μg/mL)
Table 4 IC₅₀ and limit of detection values of the pesticides (μg/mL)

农药 Pesticides	结构 Chemical structure	IC ₅₀	LOD
毒死蜱		0.093	0.004
甲基对硫磷		3.25	0.020
辛硫磷		41.6	2
三唑磷		121.6	3.8

表 5 竞争性 ELISA 法对毒死蜱人工模拟污染标本的检测结果^a

Table 5 Recoveries of chlorpyrifos-ethyl from spiked samples by IC-ELISA method

样品	毒死蜱添加量(mg/kg)	回收率(%)
苹果	0.1	87.75±0.8
	1	72.30±0.6
猕猴桃	0.1	90.03±1.7
	1	69.82±1.2
红豆	0.1	未检出 ^a
	1	74.81±0.7
玉米	0.1	92.13±0.2
	1	60.55±1.6
葱	0.1	未检出.
	1	68.38±3.7
蒜	0.1	未检出.
	1	82.39±1.8
土壤	0.1	90.45±3.7
	1	70.57±4.2
自来水 ^b	10	94.44±2.9
	100	77.30±3.4

a: 表中结果均为三次检测的平均值

b: 自来水样品中添加毒死蜱的浓度单位为 ng/mL

4 讨 论

1) 本研究所建立的竞争性 ELISA 免疫检测法对毒死蜱的最低检测限(LOD)=4 ng/mL, IC₅₀=93 ng/mL, 对甲基对硫磷的 LOD=20 ng/mL, IC₅₀=3.25 μg/mL; 而对辛硫磷和三唑磷的 LOD 分别为 2 μg/mL、3.8 μg/mL, IC₅₀ 分别为 41.6 μg/mL、121.6 μg/mL, 与前两者相比, 其检测灵敏度明显降低, 以此单克隆抗体为基础建立的免疫检测法, 对于检测具有特定结构的一组有机磷农药具有较高的灵敏度和特异性。本实验中, 对四种有机磷农药检测敏感度的差别, 推测是与其化学结构有关, 对比半抗原结构及表 1 中农药结构, 可以看出, 半抗原由芳香环和硫磷酰基两部分组成, 毒死蜱结构与所设计的组特异性半抗原结构较为接近, 甲基对硫磷为甲氧基衍生物, 而辛硫磷和三唑磷的化学结构在这两部分之间分别插入了一个氰基亚苄氨基基团和一个三唑基团。因而我们有理由认为以这种单克隆抗体为基础建立的免疫检测法, 对

不同有机磷农药检测灵敏度的差异与农药的化学结构与半抗原结构之间的相似程度有一定的相关性。化学结构与半抗原结构相似度高的有机磷农药, 如毒死蜱和甲基对硫磷, 对其检测灵敏度、检测的特异性较高, 线性检测范围也较宽范。因此, 本研究建立的方法对检测的有机磷农药具有一定的选择性, 但是由于其对不同农药的反应缺乏一致性, 尚且无法达到通用性的目的, 为提高检测方法的敏感度和检测农药通用性需对半抗原结构做进一步的改构和修饰。

2) 在 ELISA 检测法的实际应用中, 样品除含有检测目的物以外, 还可能含有其他影响检测的化合物。许多研究已经证实样品中所含的离子, 特别是 Ca²⁺对酶联免疫实验较大的影响^[4,5]; 硝酸盐、铜及镁离子等在浓度达到 250 μg/mL 以上时会抑制辣根过氧化物酶的活性^[6]。除此之外, 水和土壤提取物中的腐植酸能够与单克隆抗体非特异性的结合, 从而干扰抗体与待检测物的特异性结合^[7]。食品样品的提取过程中, 所含的色素、脂类、蛋白质以及多酚类物质会被共提取, 因而也会产生一定的基质效应^[8]。有研究表明, 水溶性溶剂可以最大限度减少基质效应, 然而大多数杀虫剂微溶于水或难溶于水, 因而必须使用有机溶剂进行提取^[9]。酶联免疫分析对有机溶剂的比例有一定限制^[10-12], 以往的研究证实, 对于任何实验体系^[13], 甲醇的容许量都不应超过 20%(V:V), 因而, 本实验将萃取液稀释至 20%后进行竞争性 ELISA 检测。

对于以上讨论的基质效应, 可以通过改变缓冲液组分或向体系中加入 BSA 等方法加以改善^[5,7,14]。由表 5 的部分添加回收率偏低, 本实验还需进一步优化各项条件, 以期本方法在实际应用中更加精确。

3) 我国对不同农产品中毒死蜱的最低限量标准 1 mg/kg; 不高于美国、日本、欧盟等出口地的限量标准。因而, 本实验所建立的竞争性间接 ELISA 检测法, 可以用于上述浓度范围内对毒死蜱农残的检测。

参考文献

- [1] 徐志凯. 实用单克隆抗体技术[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 31-40.
Xu ZK. Practical monoclonal antibody technique [M]. Beijing: Science Press, 1992: 31-40.
- [2] Manclus JJ, Montoya A. Development of enzyme linked immu-

- nosorbent assays for the insecticide chlorpyrifos: Monoclonal antibody production and immunoassay design [J]. *J Agric Food Chem*. 1996, 44(13): 4063–4070.
- [3] 刘晓波, 蔡美英. 一种简单实用纯化腹水 McAb 方法——辛酸/硫酸铵法. *华西医科大学学报*. 1999, 30 (4): 455–456.
- Liu XB, Cai MY. One simple and efficient method for purification of IgG McAb from mice ascites: caprylic acid/ammonium sulfate precipitation [J]. *J West China Univ Med Sci*, 1999, 30(4): 455–456.
- [4] Jourdan SW, Flecker JR, Herzog DP, *et al.* Determination of carbofuran in water and soil by a rapid magnetic particle-based ELISA [J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43: 2784–2788.
- [5] Rupert T, Niessner R. Influence of water contents on an enzyme immunoassay for triazine herbicides [J]. *Vom Wasse*, 1992, 78: 387.
- [6] Hottenstein CS, Hayes MC, Rubio FM, *et al.* Determination of pentachlorophenol in water and soil by a magnetic particle-based enzyme immunoassay [J]. *Environ Sci Technol*, 1995, 29: 2754–2758.
- [7] Dankwardt A, Simon D, Freitag A. Determination of non-extractable triazine residues by enzyme immunoassay: investigation of model compounds and soil fulvic and humic Acids [J]. *Environ Sci Technol*, 1996, 30: 3493–3500.
- [8] Skerritt BEAR. In detection and removal of sample matrix effects in agrochemical immunoassays[M]. Washington, D.C., 1996: 29–43.
- [9] Lopez-Avila V. Supercritical fluid extraction–enzyme-linked immunosorbent assay applications for determination of pesticides in soil and food. in *Immunoassays for Residue Analysis: Food Safety* [M]. Washington, D.C., 1996: 439–449.
- [10] Hill AS, Yin C, Ferguson BS, *et al.* Detection of the insect growth regulator methoprene in wheat grain and milling fractions using an EIA [J]. *J Agric Food Chem*, 1991, 39: 1882–1886.
- [11] Nugent P. In enzyme-linked competitive immunoassay, emerging strategies for pesticide analysis [M]. CRC Press: Boca Raton, 1992: 247–258.
- [12] Schneider P. Influence of the ELISA format and the hapten enzyme conjugate on the sensitivity of an immunoassay for s-triazine herbicides using monoclonal antibodies [J]. *J Agric Food Chem*, 1992, 40: 523–530.
- [13] Yu A, Kolosova J, Sergei A, *et al.* Comparative study of three immunoassays based on monoclonal antibodies for detection of the pesticide parathion-methyl in real samples [J]. *Anal Chim Acta*, 2004, (511): 323–331.
- [14] Keuchel C, Niessner R. Development of an enzyme immunoassay for the determination of 2, 4, 6-trinitrotoluene-probing the influence of humicAcids [J]. *Spie Proc Ser*, 1992, 1716: 40–50.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



王 茜, 硕士, 工程师, 主要从事食品安全检测技术研究。
E-mail: wanghan128@126.com