

百菌清残留阻断 ELISA 试剂盒的研制及鉴定

王玲玲^{1,2}, 职爱民¹, 邓瑞广¹, 杨艳艳¹, 张静³, 侯玉泽², 胡晓飞¹, 张改平^{1*}

(1. 河南省农业科学院农业部动物免疫学重点实验室, 郑州 450002;

2. 河南科技大学食品与生物工程学院, 洛阳 471003; 3. 河南农业大学食品科学技术学院, 郑州 450002)

摘要: **目的** 研制百菌清(Chlorothalonil, CTN)残留快速检测阻断 ELISA 试剂盒(CTN-Kit), 并对其特性进行测定。**方法** 基于一株分泌抗 CTN 高亲和力的 CTN 单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb), 应用阻断 ELISA 试验原理研制 CTN-Kit。**结果** CTN-Kit 的标准曲线呈典型的 S 型, 相关系数 $R^2=0.9922$, 符合 4 参数 logit 曲线拟合, 线性检测范围为 1.03~845.46 $\mu\text{g/L}$, 灵敏度为 2.5 $\mu\text{g/L}$, 半数抑制浓度(IC_{50})为 29.44 $\mu\text{g/L}$, 检测限为 3.0 $\mu\text{g/L}$; 黄瓜样和番茄样的平均添加回收率分别为 92.0%、94.0%, 平均批内和批间变异系数均低于 10%; CTN-Kit 与五氯硝基苯的交叉反应率(CR%)为 1.7%, 与其他竞争物几乎没有反应性; 试剂盒在 4 $^{\circ}\text{C}$ 可保存 6 个月以上。

结论 CTN-Kit 灵敏度高、准确性、重现性好, 可用于农产品中 CTN 的残留检测。

关键词: 百菌清; 单克隆抗体; 阻断 ELISA; 快速检测试剂盒

Development and authentication of a rapid competitive ELISA kit for Chlorothalonil residues

WANG Ling-Ling^{1,2}, ZHI Ai-Min¹, DENG Rui-Guang¹, YANG Yan-Yan¹, ZHANG Jing³,
HOU Yu-Ze², HU Xiao-Fei¹, ZHANG Gai-Ping^{1*}

(1. Key Laboratory for Animal Immunology of the Ministry of Agriculture, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; 3. Institute of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

ABSTRACT: Objective To develop a competitive ELISA test kit for the detection of Chlorothalonil (CTN) and determine its characteristics. **Methods** A competitive ELISA test kit for the detection of CTN (CTN-Kit) was developed based on a specific CTN monoclonal antibody (mAb). **Results** The calibration curve of the CTN-Kit was a typical sigmoidal curve, fitting a four parameter logistic equation over the range of 1.03 to 845.46 $\mu\text{g/L}$ of CTN ($R^2=0.9922$), with the sensitivity of 2.5 $\mu\text{g/L}$, IC_{50} of 29.44 $\mu\text{g/L}$ and a detection limit of 3.0 $\mu\text{g/L}$. The recoveries for CTN doping of cucumber and tomato were 92.0% and 94.0% respectively. The precision and accuracy of the assay as determined by inter-assay and intra-assay coefficient variation were both below 10%. The CTN-Kit gave a cross-reactivity of 1.7% with quintozone and little or no cross-reactivity towards other compounds. The viability of the CTN-Kit at 4 $^{\circ}\text{C}$ was above six months. **Conclusion** This CTN-Kit has a good sensitivity, accuracy and reproducibility, and is suitable for the detection of CTN in agricultural products.

KEY WORDS: Chlorothalonil; monoclonal antibody; competitive ELISA; rapid test kit.

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201003008)

*通讯作者: 张改平, 中国工程院院士, 博士生导师, 主要研究方向: 动物免疫学和药物残留。

E-mail: zhanggaiping2003@yahoo.com.cn.

1 引言

百菌清(Chlorothalonil, CTN)是美国钻石制碱公司于 1963 年开发的一种非内吸性广谱有机氯杀菌剂, 主要用于防治蔬菜、果树、经济作物、粮食作物及各种绿化草坪等的真菌病害, 在国内外广泛应用。工业上用作防霉涂料, 涂在船舶上用来防治水藻等^[1]。百菌清在土壤中经光、酶或微生物等作用后转化为羟基百菌清, 其毒性和稳定性增加且能溶于水, 对环境和食品安全造成更严重的威胁^[2]。有研究表明百菌清是一种能使动植物细胞发生遗传性突变的化学物质^[3]。因此, 很多国家都规定了百菌清在农产品中的最大残留限量。美国和欧盟规定黄瓜中百菌清的最大残留限量(maximum residue limit, MRL)分别为 5 mg/kg 和 1 mg/kg, 我国 2010 年新颁布的《食品中百菌清等 12 种农药最大残留限量》规定番茄和黄瓜中百菌清的最大残留限量为 5 mg/kg^[4]。目前 CTN 的主要依靠理化方法检测^[5-8], 需要昂贵的设备和专业培训的人员操作、检测周期长、成本较高。免疫学检测方法具有成本低、操作简便等特点, 特别适合于小分子药物的现场快速检测, 近年得到了广泛的应用^[9]。本研究应用杂交瘤技术制备了针对 CTN 单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb), 在此基础上, 成功研制出阻断 ELISA 试剂盒(CTN-Kit), 并对其性能进行了测定。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

2.1.1 实验试剂

CTN(美国 Sigma 公司), 纯度 99.0%; 羊抗鼠酶标二抗(GaM IgG-HRP), 华美公司; 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB), 上海五联化工厂; 其他试剂市售所得, 均为分析纯级; 试验用水为超纯水。

2.1.2 实验仪器

550 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); ELx-50 型洗板机(Bio-TEK 公司); AE260 电子天平(德国 METTLER 公司); HI9321 酸度计(美国 HANNA 公司); SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂); CTN mAb 1E8 为本实验室制备。

2.2 CTN-Kit 的研制

2.2.1 CTN mAb 与 GaM IgG-HRP 最佳工作浓度的确定

用方阵滴定法^[10]确定阻断 ELISA 试剂盒中 mAb

和 GaM IgG-HRP 的工作浓度。

2.2.2 阻断 ELISA 方法的建立

用二甲基甲酰胺配置 1 mg/mL 的 CTN 母液, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)进行稀释配制 CTN 标准品, 浓度分别为 0、2、4、8、16、32、64、128、256 $\mu\text{g/L}$ 共 9 个, 阻断 ELISA 基本程序参照 Tijssen 的方法^[11]测定不同浓度 CTN 标准品的抑制效价。

2.2.3 标准曲线的绘制与曲线拟合

用阻断 ELISA 测定 mAb 对不同浓度 CTN 标准品的抑制率, 以吸光率 B/B_0 (B 是 CTN 不同标准浓度的 OD_{450} 值, B_0 是 CTN 0 标准浓度的 OD_{450} 值)为纵坐标, 以不同标准品浓度的对数值为横坐标绘制标准曲线, 推导出回归方程, 进行相关回归分析。

2.2.4 CTN-Kit 的配置

CTN-Kit 的主要组成为 CTN-OVA 包被并封闭好的 8×12 孔酶标板, C1 号液(最佳工作浓度的 mAb), C2 号液(最佳工作浓度的 GaM IgG-HRP), C3 号液(底物缓冲液 A), C4 号液(底物缓冲液 B), C5 号液(终止液), CTN 标准品 1~9(0、2、4、8、16、32、64、128、256 $\mu\text{g/L}$), 洗液为 PBST(0.01 mol/L PBS 加 0.05% 的吐温-20)。

2.3 样品的预处理和 CTN-Kit 的操作方法

2.3.1 检测样品的预处理

称取 5 g 黄瓜, 用组织捣碎机捣碎后置于锥形瓶中, 加 10 mL 丙酮及 1 mL 50% 磷酸, 充分振摇 10 min 后过滤, 用 4 mL 丙酮洗涤锥形瓶 2 次, 将滤液全部转移到分液漏斗中, 并加入 20 g/L Na_2SO_4 溶液 20 mL, 摇匀后用环己烷 10 mL 提取 2 次, 静止分层后, 收集提取液旋转蒸干, 剩余物用 5 mL 甲醇溶解, 加入 5 mL PBS 振荡 10 min, 5000 r/min 离心 10 min, 取上清液用于检测。番茄的处理方法同上。

2.3.2 操作方法

第一步, 根据待测样品数量取出所需酶标板, 并标记对照孔(只加 PBST 不加 mAb)和样品孔; 每孔加入 C1 号液和待测样品各 50 μL , 室温孵育 30 min, PBST 洗涤 6 次; 第二步, 每个样品孔中加入 C2 号液 50 μL (空白孔值只加 C2 号液), 室温孵育 30 min, PBST 洗板 6 次; 第三步, 每孔加入 C3、C4 号混合液 50 μL , 室温显色反应 15 min, 加入 C5 号液 50 μL 终止反应; 第四步, 用酶标仪读取各孔 OD_{450} 值, 记录备用。结果判定: 根据各样品的 B/B_0 值在标准曲线

上求出其对应的质量浓度,或代入回归方程,计算样品质量浓度的对数值 X , 求其反对数,即为样品中所含 CTN 的质量浓度。

2.4 CTN-Kit 的性能测定

2.4.1 灵敏度

阻断 ELISA 测定 20 个不同批次的空白标准品,计算 OD_{450} 值的平均值(X)和标准差(standard deviation, SD),按照公式 $LOD=(X-2SD)/X$ 进行计算,在标准曲线上查出对应的 CTN 的质量浓度为该试剂盒理论上的检测下限(limits of detection, LOD),该浓度即为灵敏度。

2.4.2 准确度

准确度是指测定值与真实值的符合程度,用添加回收试验进行测定。将 CTN 标准品添加到黄瓜样、番茄样中,使终浓度分别为 8、16、32、64 $\mu\text{g/L}$,每个浓度设 6 个重复,以回收率和变异系数(coefficient of variance, CV)确定其准确度。

2.4.3 精密度

精密度是指同一样品多次测定结果的变化程度,反映测定结果的可重复性,以批内误差和批间误差来表示。取不同批次的 6 批试剂盒,分别在 6 d 测定 CTN 浓度为 20、40、80、160 $\mu\text{g/L}$ 的黄瓜样、番茄样,每个浓度设 6 个重复,以批内和批间 CV 确定其精密度。

2.4.4 特异性

mAb 的特异性决定了 CTN-Kit 的交叉反应性,CTN 及五氯硝基苯、敌草索、多菌灵等作为抑制物,用阻断 ELISA 测定各竞争物在 0~5000 $\mu\text{g/L}$ 范围的 OD_{450} 值,应用 4 参数 logit 法拟合抑制曲线,根据 Shelver^[12]推导的公式 $B/B_0=(A-D)/[1+(x/B)^C]+D$ 计算以 mAb 对 CTN 与各抑制物的 IC_{50} ,式中 A 为曲线最高渐进值, D 为曲线最低渐进值, B 为 IC_{50} , C 为 IC_{50} 处的曲线斜率。根据 mAb 对 CTN 与各抑制物的 IC_{50} ,按照公式 $CR\%=(IC_{50}CTN/IC_{50}抑制剂)\times 100\%$ 计算其交叉反应率($CR\%$)。

2.4.5 时间稳定性

取同一批次的试剂盒,保存于 4 $^{\circ}\text{C}$,观察保存 1、30、60、90、120、150、180 d 后的检测结果,应用 4 参数 logit 法计算曲线的相关系数,确定试剂盒的时间稳定性。

3 结果与分析

3.1 mAb 与 GaMIgG-HRP 工作浓度的确定

方阵试验结果表明,mAb 的工作浓度为 1:60000,GaM IgG-HRP 的工作浓度为 1:1000。

3.2 CTN-Kit 的标准曲线的绘制

曲线呈典型的 S 型(如图 1),符合 4 参数 logit 曲线拟合,曲线回归方程为 $Y=-0.3429X+1.0037$,相关系数 $R^2=0.9922$,根据回归方程计算出 mAb 对 CTN 的 IC_{50} 为 29.44 ng/mL 。试剂盒的线性检测范围为 1.03~845.46 ng/mL 。

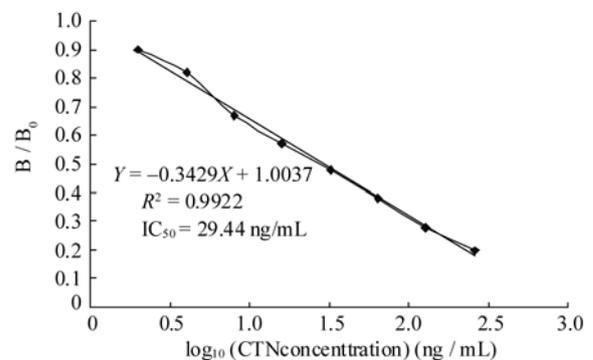


图1 CTN-Kit 标准曲线

Fig. 1 Calibration curve of CTN-Kit

3.3 灵敏度测定结果

阻断 ELISA 检测 20 个不同批次的空白标准品,所得平均值 $X=\sum X_i/n=1.024$,标准方差 $S=0.068$, $LOD=(X-2S)/X=0.867$,代入曲线回归方程计算出 $LOD=2.50 \mu\text{g/L}$,即该试剂盒的灵敏度为 2.50 $\mu\text{g/L}$ 。考虑到实际检测工作的需要和用户操作方面的误差,该 CTN-Kit 的检测限确定为 3.0 $\mu\text{g/L}$ 。

3.4 准确度测定结果

用 CTN-Kit 对已知 CTN 浓度(8、16、32、64 $\mu\text{g/L}$)的黄瓜和西红柿样品进行了添加回收试验,结果如表 1 所示。黄瓜样的添加回收率为 90.0%~95.0%,平均回收率为 92.25%, CV 为 4.6%~10.0%,平均值为 7.9%;番茄样的回收率为 91.0%~96.0%,平均回收率为 94.0%, CV 为 5.7%~9.3%,平均值为 7.7%。黄瓜和西红柿样品的 CV 平均值均小于 10%,表明该检测方法具有较高的准确度。

表 1 CTN-Kit 检测不同样品的添加回收试验
Table 1 Recovery test of CTN added to different samples by CTN-Kit

样品	CTN 浓度/($\mu\text{g/L}$)	重复数(n)	阻断 ELISA		
			平均值($\mu\text{g/L}$)	回收率/(%)	变异系数/(%)
黄瓜	8	6	7.2 \pm 0.4	90 \pm 5.0	7.9
	16	6	14.56 \pm 0.4	91 \pm 2.5	4.6
	32	6	29.9 \pm 0.89	93 \pm 2.8	9.2
	64	6	60.6 \pm 0.77	95 \pm 1.2	10.0
番茄	8	6	7.28 \pm 0.6	91 \pm 7.5	5.7
	16	6	15.2 \pm 0.54	95 \pm 3.4	8.7
	32	6	30.1 \pm 0.89	94 \pm 2.8	9.3
	64	6	61.5 \pm 0.96	96 \pm 1.5	7.1

3.5 精密度测定结果

如表 2 所示, 黄瓜和番茄样品的平均批内 CV 分别为 6.9%、7.52%, 平均批间 CV 分别为 5.7%、5.95%, 平均批间 CV 均小于平均批内 CV, 说明分批生产的 CTN-Kit 差异不大, 且均不超过 10%, 表明 CTN-Kit 具有较高的精密度。

3.6 特异性测定结果

由表 3 可知, CTN-Kit 的 IC_{50} 为 29.44 $\mu\text{g/L}$, 说明 CTN 对其 mAb 结合反应的特异性很强。CTN mAb 除与五氯硝基苯交叉反应率为 1.7% 外, 与其他竞争物交叉反应率均小于 0.5%。结果表明, CTN mAb 对 CTN 有较好的特异性。

表 2 CTN-Kit 检测不同样品的精密度
Table 2 Precision of CTN measurement from different samples by CTN-Kit

样品	CTN 浓度/($\mu\text{g/L}$)	重复数(n)	批次	平均值/($\mu\text{g/L}$)	CV/(%)	
					批间	批内
黄瓜	20	6	080323	18.2 \pm 0.32	7.7	5.4
	40	6	080326	36.8 \pm 0.89	5.4	4.0
	80	6	080338	76.4 \pm 1.5	3.8	8.3
	160	6	080416	149.8 \pm 2.7	5.9	9.9
番茄	20	6	080327	18.8 \pm 0.18	8.3	7.8
	40	6	080346	37.2 \pm 0.31	6.2	5.7
	80	6	080328	75.1 \pm 1.92	5.1	9.6
	160	6	080426	152.3 \pm 2.12	4.2	7.0

表 3 CTN mAb 与 CTN 类似化合物的交叉反应
Table 3 The cross-reactivity of CTN mAb with CTN analogous

化合物	半数抑制浓度 IC_{50} ($\mu\text{g/L}$)	交叉反应性/(%)
百菌清(chlorothalonil)	29.44	100
五氯硝基苯(quintozene)	1750	1.7
敌草索(chlorthal-dimethyl)	$>5 \times 10^3$	<0.5
多菌灵(carbendazim)	$>5 \times 10^3$	<0.5
春雷霉素(kasugamycin)	$>5 \times 10^3$	<0.5
2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)	$>5 \times 10^3$	<0.5
水胺硫磷(Isocarbophos)	$>5 \times 10^3$	<0.5

表4 CTN-Kit的时间稳定性

Table 4 Validity of CTN-Kit

保存时间/(d)	重复数 n	半数抑制浓度 $IC_{50}/(\mu\text{g/L})$	相关系数 R^2	最大 OD 值 OD_{max}
1	6	29.44	0.9922	0.995
30	6	29.45	0.9923	1.001
60	6	29.52	0.9914	0.966
90	6	29.58	0.9855	0.924
120	6	29.62	0.9876	0.877
150	6	29.69	0.9687	0.876
180	6	29.70	0.9669	0.789

3.7 时间稳定性测定结果

由表4可知,随着试剂盒保存时间的延长,各标准品的 OD_{450} 值有所减小,但其 IC_{50} 、 R^2 变化不大,曲线拟合良好,说明试剂盒在4℃6个月保存期内质量稳定。

4 结论与讨论

由于ELISA法具有快速、特异、敏感等优点,在小分子药物残留检测中被广泛采用^[12-14]。本试验选择本实验室制备的CTN mAb,依据竞争反应原理设计组装了快速检测黄瓜、番茄中CTN的试剂盒。本试验采用非均相间接竞争模式,以待测游离抗原和包被抗原共同竞争mAb上的有限位点,用HRP及其底物显色系统显示二者与mAb的结合情况,进而定量、半定量推算小分子药物在样本中的含量或定性检测。敏感性是由抗体与其对应抗原反应的亲和力大小所决定的,试验所用CTN mAb有较高的亲和力保证了试剂盒的高敏感性。准确性是由标准曲线标准点的设置决定的,根据试剂盒采用的反对数曲线拟合合成直线进行线性定量的原理,本试验将标准点 B/B_0 与CTN浓度的对数值设置在同一条曲线上体现其线性,通过添加回收试验证实,本试验所设标准点线性关系较好,灵敏度高。本试验采用交叉反应试验鉴定试剂盒的特异性,用CTN mAb与CTN结构相似物五氯硝基苯、敌草索及多菌灵、春雷霉素、2,4-D、水胺硫磷做交叉反应性试验,结果与五氯硝基苯的交叉反应率为1.7%,与其它药物交叉反应率均小于0.5%,CTN-Kit特异性较高。通过在黄瓜和番茄样中的初步应用显示,不同样品处理液对试剂盒的敏感性和检测结果影响不大。结果显示,本试验研制的CTN-Kit

可用于CTN在农产品中的残留检测。

参考文献

- [1] Liang B, Li R, Jiang D, *et al.* Hydrolytic dechlorination of chlorothalonil by *Ochrobactrum* sp. CTN-11 isolated from a chlorothalonil-contaminated soil [J]. *Curr Microbiol*, 2010, 61(3): 226-33.
- [2] Wu X, Cheng L, Cao Z, *et al.* Accumulation of chlorothalonil successively applied to soil and its effect on microbial activity in soil [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2012, 81: 65-9.
- [3] Lebailly P, Vigreux C, Godard T, *et al.* Assessment of DNA damage induced in vitro by etoposide and two fungicides (carbendazim and chlorothalonil) in human lymphocytes with the comet assay [J]. *Mutat Res*, 1997, 375(2): 205-17.
- [4] 中华人民共和国卫生部和国家农业部,国家标准化委员会.食品中百菌清等12种农药最大残留限量[S].北京:中国标准出版社,2010.
- [5] Chaves A, Shea D, Danehower D. Analysis of chlorothalonil and degradation products in soil and water by GC/MS and LC/MS [J]. *Chemosphere*, 2008, 71(4): 629-38.
- [6] Chen SF, Su YS, Jen JF. Determination of aqueous chlorothalonil with solid-phase microextraction and gas chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 896(1-2): 105-10.
- [7] Yamamoto A, Miyamoto I, Kitagawa M, *et al.* Analysis of chlorothalonil by liquid chromatography/mass spectrometry using negative-ion atmospheric pressure photoionization [J]. *Anal Sci*, 2009, 25(5): 693-7.
- [8] Vargyas LD, Walls GE, Bramstedt WR, *et al.* Simultaneous determination of chlorothalonil and hexachlorobenzene in technical and formulated materials by capillary gas chromatography: collaborative study [J]. *J AOAC Int*, 2000, 83(5): 1047-52.
- [9] Jahn C, Schwack W. Determination of cutin-bound residues of chlorothalonil by immunoassay [J]. *J Agric Food Chem*, 2001,

- 49(3): 1233–8.
- [10] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000.
- [11] Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassay [M]. Amsterdam: Elsevier, 1985.
- [12] Wu JX, Zhang S, Zhou X. Monoclonal antibody-based ELISA and colloidal gold-based immunochromatographic assay for streptomycin residue detection in milk and swine urine [J]. J Zhejiang Univ-Sci B, 2010, 11(1): 52–60.
- [13] Jahn C, Zorn H, Petersen A, *et al.* Structure specific detection of plant cuticle bound residues of chlorothalonil by ELISA [J]. Pestic Sci, 1999, 55(12): 1167–1176.
- [14] Watanabe E, Miyake S, Ito S, *et al.* Reliable enzyme immunoassay detection for chlorothalonil: Fundamental evalu-

ation for residue analysis and validation with gas chromatography [J]. J Chromatogr A, 2006, 1129(2): 273–282.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



王玲玲, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测。

E-mail: wangling0374@163.com



张改平, 中国工程院院士, 博士生导师, 主要研究方向: 动物免疫学和药物残留。

E-mail: zhanggaiping2003@yahoo.com.cn