

氯菊酯农药间接酶联免疫吸附测定法的建立

刘廷凤, 刘亚子, 孙成*

(南京大学环境学院污染控制与资源化国家重点实验室, 南京 210093)

摘要: 为测定环境样品中氯菊酯农药残留, 用活泼酯法将氯菊酯半抗原(Py)与卵白蛋白(OVA)偶联, 制备合成抗原 Py-OVA 作包被原, 建立间接竞争酶联免疫吸附测定法。方阵滴定确定了抗血清最佳稀释度(1:2500), 包被抗原的最适工作浓度 0.45 μ g/mL, 并建立了标准工作曲线。工作曲线表明在 10~800 μ g/L 浓度范围内呈良好的线性关系, 回收率>97%。

关键词: ELISA; 拟除虫菊酯; 农药; 残留分析

中图分类号: X839.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)02-0347-04

Indirect ELISA for the Pyrethroids-Permethrin Residue Detection

LIU Ting-feng, LIU Ya-zi, SUN Cheng*

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: In order to detect the permethrin (Py) residue in environment samples, Ovalbumin (OVA) was used as protein carrier to couple with semi-antigen permethrin by active ester method. Indirect competitive ELISA (icELISA) was established. The most appropriate titration of coating antigen was 0.45 μ g/mL and optimal dilution was 1/2500 correspondingly. The standard curve of icELISA was also established and the curve indicated that the lowest detection limit was 0.1 μ g/mL, the curve had a favorable linear relation with the concentration range of 10~800 μ g/mL, recoveries of permethrin (>97%) were satisfactory.

Key words: ELISA; pyrethroids; pesticide; residue analysis

随着一度占主导地位的有机磷农药从市场的逐渐退出, 菊酯类农药应用越来越广泛。其中氯菊酯占 53% 以上。尽管一般认为菊酯类农药对哺乳动物较安全, 但据报道人体接触氯菊酯后会出现免疫系统毒性和抑制性可逆症状, 甚至会造成淋巴节以及脾脏损害甚至致癌^[1]。所以需要一种灵敏、快速、高选择性的残留检测方法。酶联免疫吸附测定法(ELISA)具有准确、灵敏、快速、特异、经济等特点, 为氯菊酯残留提供了一种良好的检测手段。

尽管国内外研究者们对菊酯类农药 ELISA 检测进行了大量研究^[2], 但是还没有一种方法能够排除样品前处理过程中繁琐的溶剂提取、浓缩净化步骤, 否则建立的方法不具有足够的灵敏度。目前国内还没有相关报道。

本文采用特异性多克隆抗体, 初步建立了一种间接竞争 ELISA 检测 Py 残留的方法, 灵敏度高, 稳定性好。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

试剂: 卵白蛋白(OVA, 上海实生细胞生物技术有限公司); 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG-HRP (华美生物工程公司); *N,N*-二甲基酰亚胺(DMF, 上海试剂一厂); 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺

盐酸盐(EDC·HCl) (上海丽珠东风生物制剂有限公司); *N*-羟基丁二酰亚胺(中国医药集团上海化学试剂公司); 其余试剂均为分析纯。

仪器: 酶标仪(MK3, Labsystem, 芬兰); 双波长紫外可见分光光度计(Shimadzu, UV-190, 日本); 冷冻干燥机(Labconco, 4.5L, 美国); 高速冷冻离心机(HITACHI, 日本); 磁力搅拌器(Werke, IKA, 德国); 漩涡混匀器(MS2, IKA, 德国); 微型摇床(KSI30, IKA, 德国)。

1.2 实验方法

1.2.1 合成包被抗原 Py-OVA^[2]

按文献方法稍作修改后合成 Py-OVA。取 10mg 氯菊酯半抗原(Py)溶于 1mL DMF 中, 加入 100mg EDC·HCl, 缓慢滴加 OVA 的 PBS 溶液[5mg OVA 溶于 5mL pH7.4 (0.01mol·L⁻¹) PBS], 搅拌反应 30min 后再加入 100mg EDC·HCl, 4℃搅拌反应 24h, 过滤。UV 检测(252.5nm, 405nm)吸光度值。

1.2.2 最适包被抗原浓度和最适抗体稀释度的确定

收稿日期: 2005-01-16; 修订日期: 2005-03-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(29877010); 江苏省科学基金项目(BK2002088)

作者简介: 刘廷凤(1974~), 女, 博士研究生, 主要从事环境污染检测研究。

* 通讯联系人

采用棋盘滴定法确定. 用 MK3 型酶联免疫检测仪测定吸光度值. 选择吸光度值在 1.0 左右的抗血清稀释度和包被抗原浓度作为最佳抗血清工作稀释度和包被抗原的工作浓度. 结果见表 1.

表 1 方阵试验确定抗原包被浓度和抗体工作稀释度

Table 1 Selection of ideal antigen coating concentration and antiserum dilution

抗体稀释度	包被抗原浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$			
	0.0562	0.225	0.450	2.25
1 000	1.118	1.098	1.318	1.223
2 500	1.109	0.785	0.951	1.418
5 000	0.731	0.765	0.703	0.968
10 000	0.740	0.778	0.536	0.622

由表 1 可知包被抗原浓度为 $0.45\mu\text{g}/\text{mL}$, 抗体稀释度为 $1/2\,500$ 时吸光度值为 0.951. 故选择包被抗原浓度为 $0.45\mu\text{g}/\text{mL}$, 酶标抗体最适工作稀释度为 $1/1\,000$ (原料建议稀释度).

1.2.3 实验条件的优化

菊酯类农药尤其是氯菊酯是非极性疏水性物质, 难溶于 PBS 中. 必须先溶解在能与水混溶的某种有机溶剂中再转入水相. 而 ELISA 是很敏感的一类检测方法, 易受反应时间, 温度, 溶剂, pH 值等因素影响. 反应时间、温度通过标准化操作来控制. 氯菊酯在碱性条件下易于水解, pH 不能太高. 操作条件一般为 pH7.4. 而溶剂的影响必须通过实验确定. 有机溶剂一般选择甲醇或二甲亚砜(DMSO), 本文选择甲醇为溶剂.

以不同比例的甲醇/PBS 混合溶剂稀释氯菊酯标准品, 以上述确定的工作浓度进行间接 ELISA 反应, 选择最佳比例的甲醇/PBS 作为本文 ELISA 体系的标准品溶剂.

1.2.4 标准曲线的制备

用碳酸盐缓冲液(pH9.6, $0.05\text{mol}/\text{L}$) 稀释的包被抗原, 按确定的最适包被抗原浓度, 包被酶标板, 每孔 $100\mu\text{L}$, 4°C 过夜; 用 PBST 洗板; 每孔加新鲜配制的 2% BSA 液 $200\mu\text{L}$, 37°C 封闭 3h; 洗板(操作同上); 取配好的系列浓度标准 Py 液 $50\mu\text{L}$ 与 $1/2\,500$ 抗血清 $50\mu\text{L}$ 于小试管中混合, 37°C 温育 1h 之后每孔加 $100\mu\text{L}$, 于 37°C 温育 1h; 洗板(操作同上); 加 $1/1\,000$ 羊抗兔 IgG-HRP, 每孔 $100\mu\text{L}$, 37°C 温育 1.5h; 洗板(操作同上); 每孔加新鲜配制的 TMB 底物显色液 $100\mu\text{L}$, 37°C 暗处反应 15min; 每孔加 $2\text{mol}/\text{L}$ H_2SO_4 $50\mu\text{L}$ 终止显色反应; 静置 3min 于酶标仪 450nm 下读取吸光度值, 将标准溶液浓度对数值对抑制率作成标准曲线.

1.2.5 交叉反应率(Cross-Reactivity)

利用氯菊酯标准品和类似结构的相关化合物进行交叉反应研究. 交叉反应率 = 氯菊酯 I_{50} /其它农药 I_{50} (I_{50} 是抑制率为 50% 的吸光度时的氯菊酯标准品浓度).

1.2.6 回收率实验^[3]

氯菊酯溶于 3mL 乙醚, 再分别加至 2g 阴性土样中, 使氯菊酯在土样中的终浓度为 $1.25\text{ng}/\text{g}$, $12.5\text{ng}/\text{g}$, $125\text{ng}/\text{g}$, $1\,250\text{ng}/\text{g}$, 暗处自然挥发. 再分别加入甲醇 15mL , 超声萃取 20min, 过滤, 滤液氮气吹干, 再以 40% 的甲醇/PBS 溶解后 ELISA 检测. 由于氯菊酯的高度疏水性及非极性, 极易吸附于玻璃器皿壁上, 溶解时要充分振荡.

2 结果与讨论

2.1 最适抗原包被浓度和抗体工作稀释度的确定

系列浓度的包被抗原包被酶标板, 将所获抗血清用 PBS 作 $1/1\,000$, $1/2\,500$, $1/5\,000$, $1/10\,000$ 系列稀释, 在一 48 孔酶标板上用方阵滴定法进行确定.

2.2 实验条件的优化

有机溶剂会影响抗体抗原反应, 尽管这种影响作用机理目前尚不清楚, 但是从 ELISA 反应结果可以发现, 甲醇浓度低时, ELISA 吸光度值随着甲醇浓度增加而增加, 当甲醇浓度达到某一临界值后, 吸光度反而下降. 由图 1 可见甲醇浓度为 20% 时, 曲线尾部向上弯曲. 这是由于甲醇浓度较低, 氯菊酯只能部分溶解. 当氯菊酯浓度达到 $1\,000\mu\text{g}/\text{mL}$ 时溶液浑浊. 而当甲醇浓度为 80% 时, 吸光度值增加, 曲线几乎平坦. 这是因为甲醇浓度高则抗原抗体反应增强, 同时也增加了背景值. 甲醇浓度为 40% 时, 实验曲线基本符合 ELISA 4 参数拟合方程:

$$y = \{ (A - D) / [1 + (x/c)^B] \} + D$$

式中, A 为最大吸光度值; B 是曲线斜率; c 为 I_{50} ; D 是最小吸光度值. 以 $\ln(y - D)$ 对 $\ln(1 + x/c)$ 作图, 相关系数 $R^2 = 0.9306$. 所以最佳溶剂浓度选择 40%.

2.3 标准工作曲线

标准工作曲线在上述最佳条件下, 将标准 Py 溶液按间接竞争 ELISA 方法进行测定. 以抑制率 I 为纵坐标, Py 溶液浓度对数值为横坐标, 绘制出标准曲线. 抑制率 $I = B/B_0$ (B 为样品吸光度值, B_0 为空白对照吸光度值), 结果见图 2.

试验所获得的抗血清检测线性范围为 $10\sim$

800μg/L. 在 10~ 800μg/L 范围内 $I = B/B_0$ 与 $\lg(\text{Py})$ 有较好的线性关系, 相关系数 $R = -0.9735$, 超过 800μg/L 即出现水平直线.

绘制标准曲线时应该注意, 菊酯标准品容易光解失效, 应避光存放在 4℃冰箱, 溶液用前配制. 由于氯菊酯的高疏水性、非极性, 极易吸附于容器以及酶标板壁上, 操作时应该仔细, 尽量使反应条件平行.

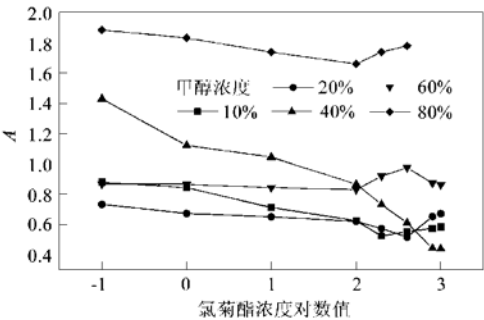


图 1 甲醇效应结果

Fig. 1 Effect of methanol concentration on the assay

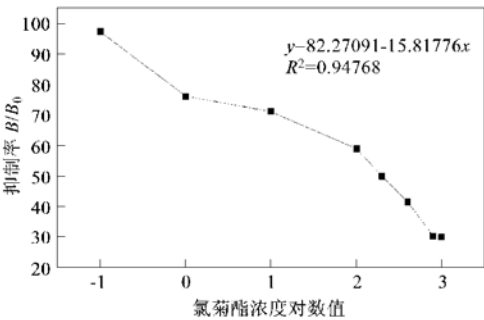
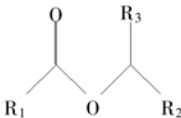


图 2 氯菊酯标准曲线

Fig. 2 Standard curve of permethrin

2.4 交叉反应率

菊酯类农药构型一般为:



利用氯菊酯标准品和类似结构的相关化合物, 在上述实验条件下进行交叉反应研究, 从表 2 数据可知: 氰戊菊酯、氯氰菊酯的交叉反应率均 < 0.06, 其它类似结构农药在试验中未观察到交叉反应. 说明本系统抗体具有较好的特异性.

2.5 回收率实验

加标样品回收率实验是检验 icELISA 方法准确度的一个重要指标, 结果见表 3.

表 2 交叉反应率测定结果¹⁾

Table 2 Result of cross reaction

农药	构型			交叉反 应率/%
	R ₁	R ₂	R ₃	
氯菊酯 permethrin		3-PhOPh	H	100
氰戊菊酯 Fenvalerate		3-PhOPh	CN	< 0.06
氯氰菊酯 Cypermethrin		3-PhOPh	CN	< 0.06
甲氰菊酯 Fenpropathrin		3-PhOPh	CN	—
溴氰菊酯 Decamethrin		3-PhOPh	CN	—
三氟氯氰菊酯 Eythlothrin		3-PhOPh	CN	—

1) —表示未检测到

表 3 回收率实验结果

Table 3 Recovery test of permethrin

氯菊酯掺含量 / μg·g ⁻¹	理论值 / ng·g ⁻¹	检出量 / ng·g ⁻¹	回收率 / %	平均值 ±SD
0.5	1.25	0.2	16	20.2 ± 3.31
		0.23	18.4	
		0.27	21.6	
		0.31	24.8	
1.0	12.5	12.1	96.8	97.8 ± 3.68
		13	104	
		11.8	94.4	
		12.0	96	
		126.3	101	
2.5	125	126.2	101	100.7 ± 0.29
		125.8	100.6	
		125.4	100.3	
		1241	99.3	
5.0	1250	1240	99.2	99.4 ± 0.23
		1247	99.8	
		1243	99.4	
		1243	99.4	

样本前处理是一项十分重要的工作. 免疫反应的高特异性和高亲和性使 ELISA 具有极高的选择性和灵敏性. ELISA 反应高选择性则使样本前处理过程变得简单, 仅需合适的提取可能就足够. 本文回

收率实验以溶剂萃取后并未经各种方法浓缩净化,加标样品的回收测试结果表明,在 12.5 ~ 1250 $\mu\text{g/L}$ 平均回收率均 > 97%, 氯菊酯浓度 < 12.5 $\mu\text{g/L}$ 时回收率只有 21%, 说明在 12.5 ~ 1250 $\mu\text{g/L}$ 范围内 ELISA 方法重复性较好。

ELISA 反应用于实际样品检测时,基体效应是一个不可避免的问题.文献[2~ 5]都以优化反应条件、萃取环境样品、以各种硅胶柱或碱性铝土柱净化浓缩样品的方法来减少基体效应.本文回收率实验时基体效应也比较明显,但是土样未经浓缩净化,仍能达到理想效果(平均回收率均 > 97%),可见本实验抗体特异性较强,体系稳定性好。

3 结论

本文建立了氯菊酯农药残留的 ELISA 检测方法,该方法敏感性和特异性较好.抗血清检测线性范围为 10~ 800 $\mu\text{g/L}$,平均回收率均 > 97%,与其它类似结构农药交叉反应率很低.氯菊酯残留 ELISA 快速检测法的建立,为菊酯类农药残留检测试剂盒的开发提供了基础,为环境安全监测提供了重要的工具。

致谢:感谢南京大学环境学院邹惠仙教授;江苏省微生物研究所赵晓联、赵春城等;江南大学张莲芬老师为本文工作提供的帮助!

参考文献:

- [1] Schimmel S C, Garnas R L, Patrick J M, *et al.* Acute Toxicity, Bioconcentration and Persistence of AC222, 705, Benthocarb, Chlorpyrifos, Fenvalerate, Methyl Parathion, and Permethrin in the Estuarine Environment [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 1983, **31**: 104~ 113.
- [2] Stanker, L H, Bigbee C, Van E J, *et al.* An immunoassay for Pyrethroids: detection of permethrin in meat [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 1989, **37**: 834~ 839.
- [3] Skerritt J H, Hill A S, McAdam D P, *et al.* Analysis of the synthetic pyrethroids, permethrin and I(R)-phenothrin in grain using a monoclonal antibody-based test [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, **40**: 1287~ 1292.
- [4] Shan G, Leeman W R, Stoutamine D W, *et al.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Pyrethroid Permethrin [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**: 4032~ 4040.
- [5] Watanabe T, Shan G, Stoutamire D W, *et al.* Development of a class-specific immunoassay for the type I pyrethroid insecticides [J]. *Analytica Chimica Acta*. 2001. **444**: 119~ 129.
- [6] Bonwick A, Abdul-Latif P, Sun C, *et al.* Comparison of Chemical Methods and Immunoassay for the Detection of Pesticide Residues in Various Matrices [J]. *Food & Agricultural Immunology*, 1994, **6**: 267~ 276.
- [7] 马悦, 刘辉. 研究生免疫学教程[M]. 大连: 大连出版社, 1998.
- [8] 周新民, 陈连颐, 王捍东, 等. SMD 残留检测的 ELISA 方法的建立和初步应用[J]. *畜牧与兽医*, 2003, **35**(10): 8~ 11.