

监测与分析

单克隆抗体酶免疫分析法测定
大米中杀虫脒残留量*

余万俊 鲁长豪 肖志芳 牟家婉 蒋中华

(华西医科大学公共卫生学院, 基础医学院, 成都 610041)

摘要 用抗杀虫脒单克隆抗体为试剂, 建立了间接竞争法、直接竞争法和标记抗原的竞争法等3种测定大米中杀虫脒残留量的ELISA法, 标准曲线上抑制率为50%时对应的杀虫脒浓度分别为1.3、1.7和5.3 ng/ml。大米样品用甲醇提取, 提取液经吸附剂柱简单净化后即可用上述ELISA对痕量杀虫脒进行定量。使用直接竞争法时, 样品加标回收率为90%—116%, 平行测定的相对标准偏差为5.1%—16%, 方法检出限为0.5 ng/g。笔者还对孵育介质pH和温度、提取剂及样品基体等因素对定量曲线的影响进行了研究和讨论。

关键词 杀虫脒, 农药残留量, 免疫分析法。

杀虫脒是一种广谱而高效的杀虫、杀螨剂, 主要用于防治水稻螟虫和棉铃虫等虫害, 曾在我国大量生产和使用。近年的研究证明该农药有致癌性^[1], 因此需对其残留进行监测。杀虫脒的经典分析方法主要有色谱法和色谱-质谱联用^[2, 3]。这些方法除需要使用昂贵的仪器设备外, 样品的提取、净化、衍生化等前处理步骤也相当繁琐费时。近年发展起来的农药残留量的免疫分析法具有灵敏度高、操作简便快速、测试费用低等优点, 正越来越多地受到人们的重视^[4]。而杀虫脒的免疫分析国内外尚未见报道。

笔者通过化学方法将杀虫脒偶联到载体蛋白上制成抗原, 然后用制备的抗原免疫BALB/c小鼠使其脾细胞致敏, 经细胞融合、筛选和克隆化等步骤, 获得了抗杀虫脒的特异性抗体^[5]。以特异性抗体作试剂, 建立了大米中杀虫脒残留量的免疫分析法。

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 牛血清白蛋白(BSA)和卵白蛋白(OA), Sigma公司。

(2) 辣根过氧化物酶(HRP), RZ>3, 华美生物工程公司。

(3) 羊抗鼠IgG-HRP结合物, 军事医学科学院。

(4) 包被抗原(杀虫脒衍生物-卵白蛋白结合物, 简记为CDM-S-OA)。

(5) 抗杀虫脒单克隆抗体^[5]。

(6) 酶底物溶液 取0.5 ml四甲基联苯胺无水乙醇溶液(2 mg/ml), 以0.05 mol/L柠檬酸-磷酸盐缓冲溶液(pH5.0)稀释至10 ml, 再加入10 μ l 3%过氧化氢, 混匀。临用前配制。

(7) 杀虫脒标准溶液(1 mg/ml) 称取杀虫脒盐酸盐118.7 mg, 用水溶解后稀释至100 ml, 4℃冰箱中保存。标准工作液用PBS-0.05% Tween(PBST)临时稀释。

(8) 96孔酶标板(天津有机玻璃制品厂)和55孔酶标板(四川分析仪器厂)。

(9) DG-3022A酶联免疫测定仪(国营华东电子管厂)。

1.2 方法

1.2.1 酶标记半抗原(CDM-S-HRP)的制备

将50 μ l 2 mol/L盐酸加至100 μ l 2 mg/ml亚硝酸钠溶液中, 混匀后立即加至带苯胺基的杀虫脒衍生物溶液中(5 mg/ml, 100 μ l), 反应15 min。加入少许氨基磺酸以分解过量的亚硝

* 国家教委博士点基金和CMB基金资助项目

收稿日期: 1995-03-08

酸。将重氮盐溶液滴入辣根过氧化物酶溶液(3.2 mgHRP 溶于 4 ml 0.1 mol/L pH8.5 硼酸盐缓冲溶液)中,同时滴入稀氢氧化钠溶液控制 pH8。反应 4 h 后,将反应产物装入透析袋,在 0.05 mol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲生理盐水溶液(PBS)中充分透析。以上反应和操作均在 0—5℃进行。将产物与等体积甘油混合后,小瓶分装,−20℃保存。

1.2.2 酶标记抗体(McAb-HRP)的制备

按文献[6]方法制备,平均每分子抗体标记了 1.8 个 HRP 分子。

1.2.3 模拟样品的制备

称取米粉各 500 g 数份,加入不同量杀虫脒乙醇溶液,待溶剂挥发后,充分混匀,装入棕色瓶中,放暗处存放 3 月以上。据报道^[7],如此加标样品具有与真实样品相似的萃取行为。

1.2.4 米粉中杀虫脒的提取和净化

每 g 米粉中加入 5 ml 甲醇,于高速组织捣碎机缸中高速捣碎 5 min,或在超声波破碎仪上破碎 15 min。取适量上清液(≤5 ml)通过填充有 2 g 氧化铝(或硅镁吸附剂)的净化柱净化。用甲醇淋洗净化柱,共收集流出液 10 ml。取出部分流出液除去溶剂后,残渣加 PBST 溶解,混匀待测。

1.2.5 杀虫脒的 ELISA 法

(1) 间接竞争法 CDM-S-OA 用 0.05 mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲溶液稀释成 1 μg/ml,加入聚苯乙烯酶标板孔中,每孔 100 μl,置 4℃冰箱中过夜。用 PBST 洗板 3 次后,加入 10 g/L BSA-PBS 溶液封闭板孔中未被占据的位点(100 μl/孔,20℃,1 h)。倒掉封闭液并洗涤。将稀释好的杀虫脒标准工作液或样品溶液与纯化的抗体溶液等体积混合,然后加入上述酶标板孔中,每孔 100 μl,平行 3 孔,20℃孵育 1 h。同上洗涤后,每孔加入 100 μl 用 10 g/L OA-PBST 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP 结合物(1:3000 稀释),20℃孵育 1 h,再次洗涤后,每孔加入 100 μl 酶底物液,显色 15 min。加入 50 μl 2 mol/L 硫酸终止反应,在酶联免疫测定仪上测定 450 nm 处吸光度。

(2) 直接竞争法 酶标板按(1)包被,封闭和洗涤后,将稀释好的杀虫脒标准工作液或样品溶液与等体积的酶标记抗体溶液(1:10000 稀释)混合,然后加入酶标板孔中,每孔 100 μl,平行 3 孔,20℃孵育 1 h。同(1)洗涤,加酶底物液显色,终止反应和测定吸光度。

(3) 标记抗原的竞争法 纯化抗体用 0.05 mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲溶液稀释至 2 μg/ml,加入酶标板孔中(100 μl/孔),4℃过夜。用 PBST 洗板 3 次,然后加入 10 g/L BSA-PBS 溶液封闭板孔中未被占据的位点(100 μl/孔,20℃,1 h)。倒掉封闭液并洗涤。将稀释好的杀虫脒标准工作液或样品溶液与等体积的酶标记半抗原溶液(1:4000 稀释)混合,取 100 μl 加入板孔,平行 3 孔,20℃孵育 1 h。同(1)洗涤后加酶底物液显色,硫酸终止反应,测定吸光度。

2 结果与讨论

2.1 杀虫脒 ELISA 法的建立

用高碘酸盐氧化法将 HRP 与抗杀虫脒单克隆抗体偶联,得到了每分子抗体标记了 1.8 个酶分子的 McAb-HRP 结合物,该标记结果被认为是较理想的^[8]。另外,用重氮化-偶合法将杀虫脒衍生物与 HRP 偶联,得到了保持酶活性的酶标记半抗原(CDM-S-HRP)。上述 2 种酶标记物的制成,为建立快速的杀虫脒免疫测定方法创造了条件。

2.2 孵育温度和 pH 对抑制曲线的影响

在试验的 pH 范围内(pH6.5—8.5),pH 较高时,产生相同抑制率对应的杀虫脒浓度更低,即抑制灵敏度更高;而温度的影响则相反,温度较低时抑制灵敏度高。综合上述 2 种因素的影响,本文实际选择的反应介质的 pH 为 7.4,孵育温度为 20℃。

2.3 溶剂对抑制曲线的影响

考查了甲醇和乙腈 2 种溶剂对抑制曲线的影响,发现二者均有影响。其中乙腈的影响更大而未选作提取剂。另外,甲醇也曾用于大米中杀虫脒的提取^[8],故对甲醇的影响作了进一步考查。结果表明,甲醇存在减弱了杀虫脒对

抗体和抗原结合的抑制作用,即降低了方法的灵敏度。甲醇浓度越大,影响越大,其中甲醇浓度的变化对间接竞争法比对直接竞争法影响更大。所以在测定中应尽可能保持甲醇浓度一致,以提高测定结果准确度。

2.4 样品基体对测定的影响

间接竞争法和直接竞争法测定杀虫脒时,样品基体对这 2 种方法均有影响,这种影响随测定前样品液稀释度的增加而减小。对于杀虫脒残留量在 $\mu\text{g/g}$ 水平的样品,由于测定前稀释倍数大,可直接取样品提取液作适当稀释后测定;但对于杀虫脒残留量在 ng/g 水平的样品,由于取样量相对较大,基体成分在测定液中相对较多,则测定前必须通过吸附剂柱净化,才能对杀虫脒准确定量。

2.5 3 种免疫分析法的标准曲线

图 1 是 3 种 ELISA 法测定杀虫脒的标准曲线。从图 1 看出,间接竞争法,直接竞争法和标记抗原的竞争法 3 种方法均有很高的灵敏度,

抑制率为 50% 时,对应的杀虫脒浓度分别为 1.3、1.7 和 5.3 ng/ml 。

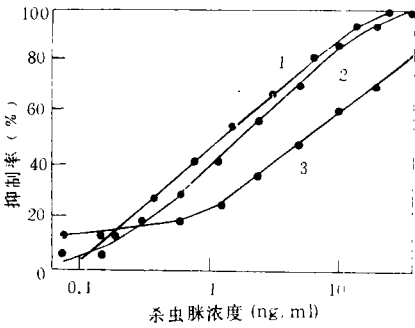


图 1 杀虫脒 ELISA 法标准曲线

1. 间接竞争法 2. 直接竞争法 3. 标记抗原的竞争法

2.6 大米中杀虫脒残留量测定和加标回收试验

表 1 是用直接竞争法测得的模拟样品中杀虫脒残留量和回收率。

从表 1 结果看出,向样品中加入 5—500 ng 杀虫脒,回收率为 90%—116% (平均 104%), 4 次平行测定的相对标准偏差(RSD)为 5.1%—

表 1 样品测定和加标回收率

样 品 号	加入量(ng)	测得量(ng)	回收率(%)	SD	RSD(%)
1		2.1		0.3	14
	5	7.8	114	0.4	5.1
	10	12.6	105	2.0	16
	20	25.2	116	2.6	10
		46		3.6	7.8
2	50	101	110	7.2	7.1
	100	143	97	15	11
	250	280	94	16	5.7
3		600		40	6.6
	500	1050	90	110	11

16%。

2.7 检出限

按文献[9]方法计算出方法的检出限(直接竞争法)为 0.5 ng/g ,符合农药残留检测的要求。

致谢 美国 FDA 管洽祥教授为本研究提供部分试剂,特此感谢。

参考文献

1 薛寿征等.环境化学.1991,10(3):53

2 默涛等编.农药残留量分析方法.上海科学技术出版社,1992:162—176

3 Mathern G C et al. J. Agric. Food Chem. . 1991, 39(4): 700

4 Van Emon J M, Lopez-Avilla V. Anal. Chem. . 1992, 64(2):79A

5 余万俊等.中国公共卫生学报.1995,14(1):62

6 北京医学院微生物教研室编.实验免疫学.北京:人民卫生出版社,1980:264—267

7 Sharp G E et al. Analyst. 1988, 113: 1493

8 庄无忌等.环境科学.1978,(4):38

9 Heckman R A et al. J. Agric. Food Chem. . 1992, 40(12): 2530

pp. 46—48

Lignin extracted from an alkaline wheat straw pulping black liquor was modified by sulfonation to study the feasibility of its use as a concrete water-reducing agent. This has resulted in the development of ZS-3 water-reducing admixture. In addition, a liquor containing sulfonated lignin and polysaccharides from the conversion process of wheat straw pulping black liquor was found to have a function of concrete water reduction and was turned into a superplasticizer ZS-2. Both ZS-3 and ZS-2 had a water reduction by 10%. The compressive strength of concrete was increased by 18% (7 days) or 5% (28 days) when ZS-3 was added, and by 73% (7 days) or 2% (28 days) when ZS-2 was added.

Key words: concrete water-reducing admixture, wheat straw lignin, sulfonation.

Small-Sized Non-Sludge-Discharged Sewage Treatment and Reuse System. Chen Xueyi et al. (Weifang Bestec Environmental Protection Engineering Development Co., Ltd., Weifang 261011); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(4), 1995, pp. 49—50

A small-sized sewage treatment and reuse system without sludge discharge has been developed, based on a process consisting of two stages of contact anaerobic filters, two stages of contact aerobic filters, a slow sand filter and a fast sand filter. Generally, a domestic sewage can be treated through this system to give a satisfactory effluent, with a BOD removal of 91.7%, a COD removal of 88.9%, a SS removal of 91.1%, and a total P removal of up to 43.5%.

Key words: excess sludge, anaerobic treatment, aerobic treatment.

Determination of Chlordimeform Residues in Rice by Enzyme Immunoassay Using Monoclonal Antibody. Yu Wanjun et al. (West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(4), 1995, pp. 51—53

Three sensitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs)—indirect competitive ELISA, direct competitive ELISA, and reverse direct competitive ELISA—with immobilized antibody were developed for the determination of chlordimeform residues in rice. Their IC_{50} are of 1.3, 1.7 and 5.3 ng/ml, respectively. Samples were homogenized with methanol in a blender or in an ultrasonic disintegrator. The extracts could be measured directly after dilution, or underwent

a simple clean up procedure, which could improve the accuracy of the ELISAs. Effects of pH in the reaction medium, the incubation temperature, the extracting agent and the sample matrix on the detection sensitivities were also studied and discussed.

Key words: chlordimeform, pesticide residue analysis, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Synchronous Scanning Derivative Spectrofluorimetry for the Determination of Selenium with 2, 3-Diaminophthalene. Zhao Zhenhua et al. (Beijing Municipal Research Academy of Environmental Protection, Beijing 100037); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(4), 1995, pp. 54—56

The synchronous fluorescence spectra of fluorescent chelate of selenium with 2, 3-diaminophthalene (DAN) and its synchronous scanning derivative spectra were studied. The specific $\Delta\lambda$ of the synchronous spectra was found to be 140 nm. The first derivative spectrofluorimetry for the determination of selenium with DAN was described. The limits of detection were 1.5, 1.9 and 3.0 for the first derivative, second derivative and normal spectrofluorimetric technique, respectively. Coefficient of variation was 6.7 for the first derivative spectrofluorimetry, and 9.2 for the normal spectrofluorimetry.

Key words: selenium, synchronous spectrofluorimetry, derivative spectrofluorimetry.

Determination of Total Organic Halogen (TOX) in Water. Zou Huixian et al. (Dept. of Environ. Sci. and Eng., Nanjing Univ., Nanjing 210093); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(4), 1995, pp. 57—60

A modified determination method for TOX was described, whereby purgeable and nonpurgeable fractions were measured respectively. Purgeable organic halogen (POX) was stripped with a mixture of N_2 and O_2 ; and nonpurgeable organic halogen (NPOX) was enriched with a Liquid-liquid Extraction (LLE) method. Both were introduced into a combustion system to change them into X^- , which were then determined with spectrophotometry. There was a detection limit of about 1 $\mu\text{mol/L}$, a variation coefficient of less than 3%, with an average recovery of 81% for 10 model compounds. The TOX concentration in the tap water from Jiangsu province was from about 217 to 483 $\mu\text{g/L}$.

Key words: purgeable organic halogen, non-purgeable organic halogen, total organic halogen,