

## 有机磷杀虫剂毒死蜱的免疫化学分析方法研究

吴刚<sup>1</sup>, 黄雅丽<sup>2</sup>, 朱国念<sup>2</sup>, 吴慧明<sup>2</sup>, 李聪<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>浙江出入境检验检疫局, 杭州 310012; <sup>2</sup>浙江大学农药与环境毒理研究所, 杭州 310029)

**摘要:** 将免疫抗原 AR-BSA 免疫兔子, 制得了高效价的抗毒死蜱多克隆抗体, 采用改良高碘酸钠法将纯化的抗体制备了酶标抗体。利用所得的抗体与酶标抗体, 分别建立了有机磷杀虫剂毒死蜱的免疫化学分析方法, 间接竞争 ELISA 法与直接竞争 ELISA 法的检测限分别为 0.0033 和 0.0042  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 它们的检测范围在 0.005~2.0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  之间, 线性关系较好。

**关键词:** 毒死蜱; 抗体; 免疫化学分析

## Study on Immunochemical Assays of Organophosphorus Insecticide Chlorpyrifos

WU Gang<sup>1</sup>, HUANG Ya-li<sup>2</sup>, ZHU Guo-nian<sup>2</sup>, WU Hui-ming<sup>2</sup>, LI Cong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Zhejiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou 310012; <sup>2</sup>Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

**Abstract:** The anti-chlorpyrifos polyclonal antibodies were obtained by using the artificial immune antigen to immune the New Zealand white rabbits. The enzyme tagged antibodies were prepared by coupling horseradish peroxidase (HRP) to the purified antibody with the modified sodium periodate method. The indirect enzyme linked immuno-sorbent assays (ELISA) and the HRP-tagged antibody direct ELISA (E-Ab) were established, respectively. The limit of detection (LOD) for the indirect ELISA and E-Ab were 0.0033 and 0.0042  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , respectively. The linear detection ranged well from 0.005 to 2.0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

**Key words:** Chlorpyrifos; Antibody; Immunochemical assays

毒死蜱[chlorpyrifos, O, O-二乙基-O-(3, 5, 6-三氯-2-吡啶基)硫逐磷酸酯], 商品名为毒死蜱、乐斯本等, 1965年由Dow Chemical Company推广使用的一种高效杀虫剂, 在世界范围内应用于粮食、蔬菜、水果及经济作物的害虫防治<sup>[1]</sup>。它对哺乳动物毒性中等, 但对非靶标水生生物毒性较高<sup>[2, 3]</sup>。毒死蜱广泛地应用于农业生产上, 是目前替代高毒有机磷杀虫剂的主要品种之一, 也是安全农产品农药残留监控的重要品种, 在粮食等作物上引起的残留问题已有所报道。而且, 环

境样品中发现毒死蜱残留的情况也日趋严重<sup>[4]</sup>, 对人们的健康构成了潜在的威胁<sup>[5]</sup>。随着人们对毒死蜱残留的毒性与环境风险的日益关注, 急需更科学、快捷和高效的检测手段。因此开发一种简单、快速, 适于农药残留现场监控的痕量分析方法具有重要的现实意义。本文在毒死蜱人工抗原的合成与鉴定的基础上<sup>[6]</sup>, 将制备的高效价的抗毒死蜱多克隆抗体, 用于毒死蜱的免疫化学分析研究, 为开发具有自主知识产权的试剂盒打下了良好的基础。

收稿日期: 2003-08-11

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(301283)

作者简介: 吴刚(1976-), 男, 湖北天门人, 硕士, 主要从事农药环境毒理学与免疫化学研究。朱国念为通讯作者, Tel: 0571-86971220; Fax: 0571-86971902; E-mail: zhugn@zju.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 试验材料 毒死蜱原药(96.78%)、毒死蜱标准品(99.5%)、甲基毒死蜱标准品(99.3%)、马拉硫磷标准品(98.5%)、对硫磷标准品(99.7%)、三氯吡啶酚标准品(98.25%)、杀螟硫磷标准品(99.5%)(均为浙江大学新农农药剂型技术有限公司提供)、辣根过氧化物酶(华美生物工程公司)、高碘酸钠、硼氢化钠、硫酸铵、正三丁胺、甘氨酸、考马斯亮蓝、十二烷基磺酸钠(SDS)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)(均为中国医药(集团)上海化学试剂公司提供)、氯甲酸乙酯(上海同济微量元素研究所)、丙烯酰胺(acrylamide, Acr)、甲叉双丙烯酰胺(bis-acrylamide, Bis)、过硫酸铵(ammonium persulfate, AP)、四甲基乙二胺(TEMED)、乙二胺四乙酸二钠、三羟甲基甲烷(tris)、溴酚蓝、二硫苏糖醇、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)(均为上海生工生物工程有限公司提供)、过氧化氢尿素(美国Sigma公司)、奈氏试剂、 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸、 $0.15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)。

1.1.2 试验仪器 电泳仪EPS3501XL、电泳槽型号-Mighty small II SE250/SE260(美国Pharmacia公司)、细胞分子成像系统EDSA120(美国KODAK公司)、低温冰箱(SIEMENS公司)、透析袋(允许分子量不超过6000D,华美生物工程公司分装)、ML-902型定时电磁搅拌机、酶联(Bio-Rad550型)、冷冻干燥机(ALPHA1-4)、低温离心机(HITACHI SCR20BC)、96孔聚苯乙烯酶标板(浙江临海分析仪器厂)及常规玻璃器皿。

### 1.2 试验方法

1.2.1 抗体的纯化与鉴定 将免疫抗原AR-BSA免疫兔子,制得了高效价的抗毒死蜱的抗血清,采用辛酸-硫酸铵盐析法纯化抗体<sup>[7]</sup>,然后采用SDS-PAGE电泳鉴定抗体的纯度<sup>[10]</sup>。SDS-PAGE电泳的条件为:浓缩胶4%,分离胶8%,电泳缓冲液为Tris-甘氨酸缓冲液,每孔电流3mA,电泳2.5h。凝胶在37℃的0.05%考马斯亮蓝溶液中染色30min,在甲醇冰醋酸脱色液中脱色至背景清晰。

1.2.2 酶标抗体的制备与鉴定 采用改良高碘酸钠法<sup>[8]</sup>制备酶标抗体,并利用直接竞争ELISA法(或E-Ab法)对其进行免疫学鉴定,测定酶标抗体的效价及与毒死蜱的识别反应。

1.2.3 抗原抗体最适工作浓度的选择 用方阵试验法分别对间接竞争ELISA法和E-Ab法中抗原、抗体的工作浓度,进行筛选和确定,最终以 $OD\approx 1.0$ ,且包被抗原和抗体的浓度均较低的组合为最适工作浓度。

1.2.4 毒死蜱与纯化抗体及酶标抗体的亲合性考察及标准曲线的建立 毒死蜱与纯化抗体及酶标抗体的结合反应能力(亲合力)分别采用间接竞争ELISA法和酶标抗体直接竞争ELISA法来进行考察。通过测定毒死蜱对抗体(或酶标抗体)与固相抗原结合的抑制作用大小来反映毒死蜱与抗体的竞争性结合能力。具体步骤参照朱国念<sup>[9]</sup>。

1.2.5 抗体的特异性考察 采用E-Ab法对毒死蜱及其结构类似物进行交叉反应,以考察抗体的特异性,得到各种农药的抑制中浓度,然后比较它们对抗体的亲合性。常用交叉反应活性作为评价的重要标准,交叉反应率越小,反应的特异性越强。

$$\text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{抑制率为50\%毒死蜱的浓度}}{\text{抑制率为50\%其它农药的浓度}} \times 100\% \quad (1)$$

### 1.2.6 样品的测定

(1)叶菜的ELISA分析方法:将甘蓝样品切碎后,称11份,每份20g,分别装入三角瓶中。添加3个不同水平的毒死蜱丙酮标准溶液到样品中,使其中毒死蜱含量分别为2、0.1和 $0.05\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,摇匀,重复3次,共9个样品,余下的2个作空白对照。静置30min后,在样品中加入50ml的丙酮和20g无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,放在高速组织捣碎机上提取5min。

提取完毕后,提取液用布氏漏斗抽滤,用30ml的丙酮冲洗滤渣,抽滤完毕后,移入到250ml的平底烧瓶中。用旋转蒸发器浓缩近干,吹干后,用丙酮定容至10ml,取100 $\mu\text{l}$ 用PBST定容至1ml,进行ELISA分析。

(2)叶菜的气相色谱分析方法:叶菜样品的制备与毒死蜱的添加浓度同前,其余步骤参照李本昌<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗体的纯化与鉴定

将制得的高效价抗毒死蜱的抗血清, 采用辛酸-硫酸铵盐析法纯化抗体, 经 SDS-PAGE 电泳鉴定其纯度 (图 1), 说明本方法纯化所得的抗体已达到电泳纯。



A. 纯化前抗血清蛋白图谱; B. 纯化后抗血清蛋白图谱  
A. The tape of anti-AR serum before purification;  
B. The tape of anti-AR serum after purification

图 1 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.1 SDS-PAGE electrophoresis

### 2.2 酶标抗体的鉴定

根据方阵滴定原理, 采用固相包被抗原 (AR-OVA) 直接竞争 ELISA 法, 测定采用改良高碘酸钠法制备的辣根过氧化物酶标抗体的效价。当包被抗原 AR-OVA 的浓度为  $4.0 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  时, 酶标抗体的效价为  $1.25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 其效价曲线见图 2。

### 2.3 抗原抗体最适工作浓度的选择

用方阵试验法分别对间接竞争 ELISA 法和 E-Ab 法中抗原、抗体的工作浓度, 进行筛选和确定, 结果分别见表 1 和表 2。由表 1 和表 2 可知, 间接竞争 ELISA

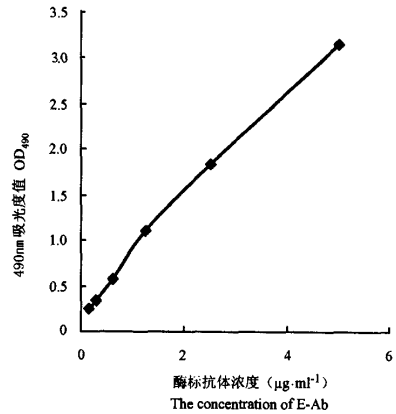


图 2 酶标抗体的效价曲线

Fig.2 The titer curve of the HRP tagged antibody

表 1 间接竞争 ELISA 法中抗原抗体的最适工作浓度方阵试验结果<sup>1)</sup>

Table 1 Experimental results for proper concentrations of Ag/Ab by indirect ELISA

抗体浓度 Concentration of Ab ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	包被抗原浓度 Concentration of coating antigen ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )					
	0.1	0.25	0.5	1	2	4
0.10	0.64	0.81	0.82	0.95	1.06	1.15
0.25	1.06	1.28	1.57	1.58	1.68	1.87
0.50	1.64	1.97	2.23	2.35	2.62	2.87
1.00	2.53	2.86	3.17	3.35	***	***
2.00	3.02	3.33	***	***	***	***
4.00	3.30	3.45	***	***	***	***

<sup>1)</sup>\*\*\* 表示超出酶标仪的量程。下同 \*\*\* out of the range for detection. The same as below

表 2 直接竞争 ELISA 法中抗原与酶标抗体的最适工作浓度方阵试验结果

Table 2 Experimental results for proper concentration of Ag and HRP labeled Ab by direct ELISA

酶标抗体浓度 Concentration of E-Ab ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	包被抗原浓度 Concentration of coating antigen ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )					
	0.5	1	2	4	8	16
0.5	0.24	0.38	0.57	0.74	0.83	0.91
1	0.36	0.58	0.88	1.20	1.35	1.52
2	0.60	0.98	1.53	2.01	2.21	2.42
4	0.97	1.56	2.35	3.04	3.38	3.40
8	1.74	2.41	***	***	***	***
16	2.61	***	***	***	***	***
32	3.40	***	***	***	***	***
64	***	***	***	***	***	***

法的最适工作浓度是：包被抗原为  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，抗体为  $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ；E-Ab 法的最适工作浓度是：包被抗原为  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，酶标抗体为  $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

2.4 抗体的特异性考察

用直接竞争 ELISA 法检测毒死蜱、毒死蜱结构类似的化合物及毒死蜱的代谢产物对获得的多克隆抗体的抑制试验结果显示，当对抗体的抑制率为 50% 时，毒死蜱的浓度为  $0.275 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，抗体物的交叉反应率均小于 2.0%（甲基毒死蜱除外），可知该抗体的特异性较好。该抗体对三氯吡啶酚交叉反应率为 1.5%、甲基毒死蜱为 119%、马拉硫磷  $< 0.15\%$ 、对硫磷为 0.16%、杀螟硫磷为 0.34%。Manclus<sup>[11,12]</sup> 选用了甲基毒死蜱、皮蝇磷、溴硫磷、毒壤磷、除线磷、保棉磷及对硫磷等农药与抗毒死蜱的抗体作了交叉反应，结果表明，所制备的抗体与甲基毒死蜱的交叉反应率仍较大，达到 183%，这是由于毒死蜱与甲基毒死蜱的结构极为相似。

2.5 标准曲线和检测灵敏度

采用间接竞争和直接竞争 ELISA 法，分别建立毒死蜱的免疫化学分析方法，根据抑制率[公式(2)]与农药浓度之间的半对数关系作图，即得其标准曲线。

其中  $OD_{\text{max}}$  为不加农药时的吸光值， $OD_x$  为加农药时的吸光值， $OD_{\text{min}}$  为空白对照孔的吸光值。计算的标样值绘成为一个对应毒死蜱浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) 的半对数坐标系统曲线图，如图 3。对应样品浓度可从校正曲线读出，也可根据标样的浓度与抑制率求出线性方程，然后求出对应样品的浓度。包被抗原间接竞争 ELISA 法的线性回归方程为： $y=16.364\log C + 60.601 (R^2 = 0.973)$ ；包

被抗原直接竞争 ELISA 法的线性回归方程为： $y=16.56\log C + 59.344 (R^2 = 0.9712)$ 。根据回归方程，分别计算各种方法中毒死蜱在规定实验条件下对抗原抗体反应抑制 50% 和 20% 所需浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) 即  $I_{50}$  和  $I_{20}$ ，以此衡量方法的灵敏度，以  $I_{20}$  作为方法的检测限，则间接竞争 ELISA 法与直接竞争 ELISA 法的检测限分别为  $0.0033 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  和  $0.0042 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ；间接竞争 ELISA 法的  $I_{50}$  为  $0.224 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，而直接竞争 ELISA 法的  $I_{50}$  为  $0.275 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，检测范围在  $0.005\sim 2.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  之间，2 种方法的线性相关性均较好。

2.6 样品的测定结果与比较

甘蓝样品采用 ELISA 法与 GC 法，测定结果如表 3，可知 2 种方法的相关性较好，满足农药残留分析的要求。

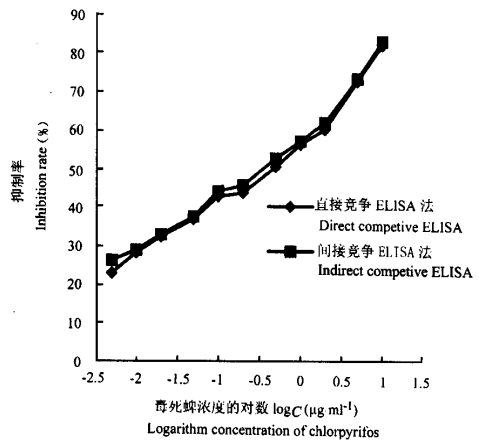


图3 毒死蜱的标准曲线

Fig.3 Standard curves for chlorpyrifos

$$\text{抑制率} (\%) = \frac{(OD_{\text{max}} - OD_{\text{min}}) - (OD_x - OD_{\text{min}})}{(OD_{\text{max}} - OD_{\text{min}})} \times 100\% \quad (2)$$

表3 直接竞争 ELISA 法与 GC (FPD) 测定样品中毒死蜱添加回收率试验

Table 3 Comparison of the recoveries of chlorpyrifos spiked into samples tested by ELISA and GC(FPD)

浓度 Concentration ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	ELISA (E-Ab) 法测定结果 Result of ELISA (E-EAb)		GC (FPD) 法测定结果 Result of GC (FPD)	
	平均回收率 Recovery (%)	CV (%) (n=3)	平均回收率 Recovery (%)	CV (%) (n=3)
0.05	93.34	4.00	89.50	3.05
0.10	89.35	3.90	90.87	2.92
2.00	88.97	2.12	87.86	2.86

### 3 讨论

本研究将制备的高效价的抗毒死蜱多克隆抗体,用于毒死蜱的免疫化学分析研究。间接竞争ELISA法的灵敏度稍高,它的抗体用量少,不需要制备酶标抗体或酶标半抗原,但分析步骤多,耗时长。酶标抗体直接竞争法的关键是制备高质量的酶标抗体,酶标抗体既要有较好的酶活性,还要保持与抗原的结合能力,这就要求每个抗体分子均能结合1个酶分子,若它含有未标记的抗体将降低分析的灵敏度<sup>[12]</sup>。以上试验数据,为进一步开发具有自主知识产权的试剂盒打下了良好的基础。

### References

- [1] 刘乾开,朱国念.新编农药使用手册.上海:上海科学技术出版社,1999:60-62.  
Liu Q K, Zhu G N. *New Manual of Pesticides*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press,1999:60-62. (in Chinese)
- [2] Tafuri J, Roberts J. Organophosphate poisoning. *Annals of Emergency Medicine*, 1987, 6: 193-202.
- [3] Ward S, Arthington AH, Pusey BJ. The effects of a chronic application of chlorpyrifos on the macroinvertebrate fauna in an outdoor artificial stream systems:Species responses. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 1995, 30: 2-23.
- [4] Hallberg G R. Pesticide pollution of groundwater in the humid United States. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 1989, 26: 299-367.
- [5] Cochran R C, Kishiyama J, Aldous C, Carr W C, Pfeifer K F. Chlorpyrifos-hazard assessment based on a review of the effects of short-term and long-term exposure in animals and humans. *Food & Chemical Toxicology*, 1995, 33: 165-172.
- [6] 朱国念,吴刚,吴慧明.有机磷杀虫剂毒死蜱人工抗原的合成与鉴定.中国农业科学,2003,36(6):657-662.  
Zhu G N, Wu G, Wu H M. Synthesis and identification of the antigens for the organophosphorus insecticide chlorpyrifos. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36(6): 657-662. (in Chinese)
- [7] 赵永芳.生物化学技术原理及其应用.武汉:武汉大学出版社,1999:324-327.  
Zhao Y F. *The Principle and Application of Biochemical Technology*. Wuhan: Wuhan University Press,1999:324-327. (in Chinese)
- [8] 杨利国,胡少昶,魏平华.酶免疫测定技术.南京:南京大学出版社,1998:204-211.  
Yang L G, Hu S C, Wei P H. *Enzyme Immunoassay Technology*. Nanjing: Nanjing University Press,1998:204-211. (in Chinese)
- [9] 朱国念,杨挺,吴银良.抗克百威多克隆抗体的研制.中国农业科学,2002,35(8):1025-1029.  
Zhu G N, Yang T, Wu Y L. Development of anti-carbofuran antibodies. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(8): 1025-1029. (in Chinese)
- [10] 李本昌.农药残留量实用检测方法手册(1).北京:中国农业科技出版社,1995:117-119.  
Li B C. *Practical Manual for Detection Pesticide Residues* (1). Beijing: China Agricultural Sciencetech Press,1995:117-119. (in Chinese)
- [11] Manclus J J, Primo J, Montoya A. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for the insecticide chlorpyrifos. 1. Monoclonal antibody production and immunoassay design. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1996, 44: 4052-4062.
- [12] Manclus J J, Primo J, Montoya A. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for the insecticide Chlorpyrifos. 2. Assay optimization and application to environmental waters. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1996, 44: 4063-4070.

(责任编辑 王红艳)