

农药残留酶联免疫吸附分析技术研究进展

刘冰 魏松红*, 尹晓东 何智勇 白莹莹 (沈阳农业大学植物保护学院, 辽宁沈阳110161)

摘要 酶联免疫吸附分析法具有灵敏度高、特异性强、方便快捷的特点,在现场筛选和大量样品的快速检测中显示了其独特的优势。简要介绍了农药残留酶联免疫吸附分析技术的关键环节及其应用,并对该技术存在的问题和应用前景进行了讨论。

关键词 农药残留;酶联免疫吸附分析;半抗原;抗体

中图分类号 S481+.8 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)21-06484-01

Research Progress in the Technology of ELISA for Pesticide Residues

LIU Bing et al (School of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract The method of ELISA with high sensitivity, the strong particularity, simple and rapid showed its unique superiority in field analysis and sample rapid monitoring. In this paper, the key steps application of ELISA in rapid monitoring of pesticide residues were introduced and some questions and the new perspective in the technology were also discussed.

Key words Pesticide residues; ELISA; Hapten; Antibody

传统的农药残留分析方法有GC法、HPLC法、GC-MS法、LC-MS法等,这些方法虽然灵敏、准确,但样品前处理繁琐,检测时间长,耗资大,技术性要求高,且仪器昂贵,不适合大量样品的快速检测。随着免疫分析技术在生物技术领域的迅猛发展,使其在农药残留分析中得到了应用,尤其是酶联免疫吸附分析(ELISA)技术具有特异性强、灵敏度高、方便快捷、分析容量大、检测成本低、安全可靠等优点,该技术将会在农药残留监测和控制、保证食用农产品安全和国际间贸易中发挥其重要的作用。

1 ELISA 技术的关键环节

1.1 半抗原的合成设计 半抗原的结构是否合理,并以此能否制备稳定且有良好免疫原性的人工抗原是ELISA法建立的关键环节。典型的半抗原结构中应具备适当末端活性基团,如 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 等;同时活性基团与载体之间应具有一定长度的间隔臂,一般为4~6个碳链长度(0.5~0.8 nm);半抗原主体结构中尽量含有芳香环,这样形成的抗原具较强免疫原性。另外,半抗原的设计应考虑到农药亲体和有毒理学意义的代谢物,针对被测定对象是单一的农药或某一类农药,设计中应相应地突出特定农药的结构或一类农药中共有的结构部分,制成单一的特异性抗体和簇特异性抗体。

1.2 人工抗原的合成

1.2.1 直接方法合成人工抗原。 农药分子半抗原如果有反应功能团,则可根据具体情况用适当的双功能交联试剂与交联方法使半抗原与载体偶联。对于羧基半抗原,可利用羧基通过混合酸酐法、活泼酯法或碳二亚胺法等方法;对于氨基半抗原,则多采用重氮化法或戊二醛法;对于羟基半抗原则可直接与丁二酸酐衍生后再与蛋白质交联;对于巯基半抗原则可通过同源或异源双功能试剂交联;而酮基半抗原则常用氨基氧乙酸化。如徐勤惠等用碳二亚胺法合成了苯甲托品的免疫抗原^[1], Mui a 等用混合酸酐法合成的免疫抗原^[2], Artorio 等利用活泼性酯法合成了三氮苯类除草剂的免疫抗原^[3]。脂肪胺类农药分子可在水溶性碳二亚胺的作用下,

与载体蛋白分子上的羧基结合成免疫抗原^[4]。

1.2.2 衍生方法合成人工抗原。 如果农药分子中不含有反应功能团,则需先通过衍生过程在农药分子内产生活性功能团再用双功能交联试剂使之与蛋白质交联。不同的农药应选择与之相适用的衍生方法,目前比较常用的有以下方法:用与半抗原结构相似的但有反应活性基团的商品化学试剂,如甲萘威分子本身没有可以用来与蛋白质直接偶联的基团,但可以用比甲萘威分子多一个氨基基团的商品化学试剂作甲萘威人工抗原合成时的半抗原^[5];对其分子进行改造使分子内产生羧基基团,如甲基毒死蜱人工抗原的合成^[6];在分子内引入活泼元素氯,利用氯原子的活泼性达到所需反应的目的,如克百威人工抗原合成时,先在克百威分子苯环上反应产生一个氯原子,然后再用重氮化方法与载体连接^[7];重新合成半抗原,并在合成过程中选择适当步骤用一个有反应功能团的分子参与反应,从而合成出有反应功能团的半抗原分子,如福美双人工抗原的合成,先用一个含羧基和氯原子的化合物作为第一步反应底物,经3步合成出含羧基基团的半抗原^[8];选择半抗原的代谢产物来合成人工抗原,如禾草灵和菊酯的代谢产物中有一个含羧基基团的产物,仍含有上述农药母体分子的基本结构,可用于与蛋白质偶联制备出能识别菊酯和禾草灵的抗体^[9-10]。

1.3 抗体的制备 制备抗体对抗原的亲合性高低对分析方法的灵敏度、选择性、交叉反应性影响很大,最终影响农药免疫分析方法应用的效率。目前,制备的抗体分为多克隆抗体、单克隆抗体和重组单链抗体。

多克隆抗体是免疫分析方法中常用的抗体类型,该克隆产生的抗体偶尔会不识别农药分子,从而影响了标准曲线的准确性。大多数情况下,该问题可通过引入不同的桥连基团或采用不同的ELISA固相配体合成方法得以避免。此外,还可通过制备单克隆抗体来提高分析的特异性及灵敏性,此抗体不仅特异性高,而且产生抗体的单克隆细胞可在体外传代繁殖,不受动物免疫时间限制。近些年来,随着人们对免疫球蛋白结构的认识和DNA重组技术的发展,抗体进入了第3个发展阶段——抗体库。将多种抗原一起免疫小鼠,免疫后无菌条件下取出小鼠脾,提取脾细胞总RNA。以RNA逆转

基金项目 沈阳农业大学中、青年硕士生导师资助项目。

作者简介 刘冰(1982-),男,辽宁锦州人,硕士研究生,研究方向:农药学。* 通讯作者,博士,副教授。

收稿日期 2007-03-26

(上接第6484页)

录合成的cDNA为模板,PCR扩增抗体,将抗体中的轻重链连接成单链抗体ScFv(Single chain variable fragment)。这些重组抗体比常规单、多克隆抗体的生产速度快,可通过诱变改变抗体特性,使抗体的特异性更强,而且最明显的优势是利用这项技术生产的噬菌体抗体库可同时检测多个农药残留,可制备成试剂盒用于农药残留检测。Alcocer等^[11]在埃希氏大肠杆菌中进行抗乙基毒死蜱抗体重组,经比较重组单链抗体无论从交叉反应率还是从检测限方面均比相应的单、多克隆抗体有较大程度改善。

2 ELISA法在农药残留快速检测中的应用

自从Hammock等首次将免疫技术用于农药残留分析以来,已有几十种农药建立了酶联免疫吸附分析方法,该技术开发的产品——酶联免疫试剂盒在农药残留快速检测中得到了广泛的应用。目前国外已研制的酶免疫试剂盒,包括有机磷类、氨基甲酸酯类、硫代氨基甲酸酯类、有机氯类、三类、拟除虫菊类及酰胺类等。美国使用的ELISA试剂盒对有机磷农药的最小检出浓度达20 μg/kg,对氨基甲酸酯类农药的最小检出浓度达300 μg/kg。有些农药试剂盒使用测试管和配套的分光光度计检测,如美国Millipore公司生产的各种EnviroGard™试管测试试剂盒。另一种较好的农药试剂盒是采用96孔酶标板和酶标仪进行分析,这种方法分析的样品量多且可重复实验,还可以定量测定。我国自行研制的农药残留检测试剂盒还很少,目前试剂盒的市场被国外公司占领,样品检测的成本较高,单个样品的检测费达80~100元,极大地限制了试剂盒的应用与推广,因此研究农药残留检测ELISA试剂盒具有很大的社会效益、经济效益和环境效益。

3 存在的问题及应用前景

农药残留酶联免疫吸附分析技术经过多年的发展,已经取得了可喜进展,但仍存在一些尚待解决的问题。ELISA一个显著特点是特异性高,一种农药的抗体一般只能检测这种农药或结构相类似的少数农药,应用多探针标记法或多组分定位包

被法在一定程度上能解决这一问题,为多种农药暴露检测以及混配农药分析创造了条件。在免疫分析过程中出现的交叉反应导致检测的可靠性和灵敏度降低,通过化学方法封闭或突出某个(某些)特定的抗原决定簇,就可制备该决定簇的特异性抗体,以增加检测的特异性,避免交叉反应;把免疫分析与其他技术联用,既可增加检测的灵敏度又可降低交叉反应。虽然酶联免疫吸附分析技术尚存在一定局限性,暂时不能完全替代传统的仪器分析技术,但以其自身优势及检测方法的不断完善,尤其是亲和力高、特异性强的抗体生产技术的突破和日臻完善,酶联免疫分析技术必将在农药残留快速检测中发挥越来越显著的作用。

参考文献

- [1] 徐勤惠, 荣泰康. 苯甲托品人工抗原的制备及结合比的测定[J]. 中国免疫学杂志, 1991, 7(5): 309 - 311.
- [2] MARIA HILAR MARCO, SHIRLEY J GEE, HONG MCHENG, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for carbaryl [J]. J Agric Food Chem, 1993, 41: 423 - 430.
- [3] ANTONIO ABAD, ANGEL MONTOYA. Production of monoclonal antibodies for carbaryl from a hapten preserving the carbamate group [J]. J Agric Food Chem, 1994, 42: 1818 - 1823.
- [4] 董国伟, 王沫, 刘贤进, 等. 兔抗甲胺磷多克隆抗体的制备[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(4): 340 - 343.
- [5] ANTONIO A, JAI ME P, ANGEL M. Development of an ELISA to carbaryl. 1. Antibody production from several hapten and characterization in different immunoassay formats [J]. J Agric Food Chem, 1997, 45(4): 1486 - 1494.
- [6] MARCOS J, CHRISTINE D, HEATHER A, et al. Properties of polyclonal, monoclonal, and recombinant antibodies recognizing the organophosphorus pesticide Chlorpyrifos ethyl [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(9): 4053 - 4059.
- [7] 刘曙照, 冯大和, 陈美娟, 等. 对克百威具高度特异性的免疫分析技术研究分析[J]. 科学学报, 2000, 16(5): 373 - 378.
- [8] GUOMINS, WHITEEY R, DONALD W, et al. ELISA for the pyrethroid permethrin [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(9): 4032 - 4040.
- [9] JUNG F, MEYER H, HAMM R. Development of a sensitive ELISA for the fungicide fenpropimorph [J]. J Agric Food Chem, 1989, 37(4): 1183 - 1187.
- [10] SCHWALBE M, DOME, BEYERMANN K. Enzyme immunoassay and fluorimetric immunoassay for the herbicide Dielder methyl [J]. J Agric Food Chem, 1984, 32(4): 734 - 741.
- [11] ALCOCCER MJ, DOYEN C, LEE H A, et al. Properties of polyclonal, monoclonal and recombinant antibodies recognizing the organophosphorus pesticide chlorpyrifos ethyl [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(9): 4053 - 4059.