

生物素-亲和素放大酶联免疫吸附法测定 二乙基磷酸酯类有机磷农药

王磊¹ 张丽杰¹ 吕伟¹ 韩世鹤^{1,2} 张付凯¹ 潘家荣^{*1}

¹(中国农业科学院农产品加工研究所/农业部农产品加工与质量控制重点实验室,北京 100193)

²(陕西师范大学食品工程与营养科学学院,西安 710062)

摘要 基于生物素和亲和素之间发生特异性反应,形成多酶系统,建立了二乙基磷酸酯类有机磷农药的竞争酶联免疫分析技术和生物素-亲和素放大酶联免疫分析技术。在优化条件下,二乙基磷酸酯类有机磷农药浓度在 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^4$ ng/L 范围内与抑制率线性关系良好,其线性回归方程为 $y = 0.1168x + 0.6259$ ($r = 0.9889$),半抑制浓度和检出限分别为 34 ng/L 和 0.0248 ng/L,与间接竞争酶联免疫分析方法相比,在交叉反应率基本不变的情况下,检测灵敏度和检测范围都得到显著提高,实际样品的加标回收率为 70.1% ~ 117.8%,基本满足痕量物质分析的要求。

关键词 农药;二乙基磷酸酯类有机磷;生物素-亲和素放大酶联免疫吸附法

1 引言

有机磷农药作为一类高效、广谱的杀虫剂、除草剂等已被广泛用于农业生产中长达 60 余年^[1],但其不合理使用与滥用所导致的环境及农产品中残留过高已严重危及人的健康安全,同时也严重阻碍着我国的农产品出口贸易。因此,建立可靠、灵敏、快速、简便的有机磷农药残留分析方法,对严格控制农药残留、保护生态环境和保障人类健康有着重要意义。与色谱技术相比,免疫学方法具有低成本、高通量、方便携带等优点^[2,3],但间接竞争酶联免疫吸附分析法(Indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay, Ci-ELISA)通常一次只能检测一种农药残留,限制了其应用。多残留免疫分析技术可实现一次同时检测多种农药残留,成为农产品质量安全领域的高新技术,也是目前的研发热点和发展趋势。文献[4]介绍了敌敌畏、乙酰甲胺磷、乐果等高毒有机磷农药残留免疫分析方法。李永祥等^[5]合成了系列半抗原及抗原,制备了 4 种宽谱特异性抗体,检测了二甲氧基硫代磷酸酯类农药。刘贤进等^[6]利用通用结构抗体的方法,制备了二乙基磷酸酯类有机磷农药残留的多克隆抗体,建立了针对一类农药残留的酶联免疫吸附分析方法,但是灵敏度较低。为了提高检测灵敏度,除制备效价高、特异性强的抗体,还可引入信号放大作用。20 世纪 70 年代后期,利用生物素与亲合素的高亲和力(亲和常数高达 10^{15} L/mol)的新型生物反应信息放大系统在免疫学检测中得到应用^[7]。高翔等^[8]以酶联免疫方法为基础,结合生物素-链霉亲和素系统的放大作用,建立直接竞争生物素链霉亲和素放大酶联免疫(Biotin-Avidin enzyme linked immunosorbent assay, BA-ELISA)检测方法,并将其用于猪肉肌肉组织中莱克多巴胺残留的检测,样品检出限为 (0.3 ± 0.1) ng/kg。本研究利用生物素-亲和素放大技术,建立了 O₂O-二乙基磷酸酯类有机磷农药的酶联免疫检测分析方法,为提高有机磷农药残留检测的灵敏度提供了新方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

MULTISKAN MK3 酶联免疫检测仪(美国 Thermo 公司);MJ-280BP01A 搅拌机(广东美的生活电器制造有限公司);FM 200 高剪切分散乳化机(上海 FLUCO 流体机械制造有限公司);96 孔聚苯乙烯酶标板(美国 Corning 公司)。

辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠二抗(HRP-IgG,北京索莱宝生物科技有限公司);生物素标记羊抗小鼠二抗和辣根过氧化物酶标记亲和素(北京博奥森生物科技股份有限公司);优级胎牛血清(杭州四季青公

2010-05-27 收稿;2010-11-07 接受

本文系“十一五”国家高技术研究发展计划(863 计划, No. 2006AA10Z449)资助

* E-mail: panjr@263.net

司); 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂(美国 Sigma 公司); 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(TMB)(北京博奥森生物科技股份有限公司); 雌性 Balb/c 鼠(7~ 8 周龄, 体重 20~ 22 g) 购自北京兴隆实验动物养殖场。

2.2 人工抗原和多克隆抗体的制备与鉴定

以二乙基磷酸乙酸(Diethylphosphonoacetic acid, DPA)为通用结构前体, 利用活化酯法与牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA)和卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)偶联, 制备免疫原(DPA-BSA)和包被原(DPA-OVA), 具体参考文献[9]。

将所制得的免疫原与弗氏完全佐剂混合, 免疫 Balb/c 小鼠, 免疫原与弗氏不完全佐剂混合加强免疫, 免疫原冲击免疫制备多克隆抗体, 纯化后分装于- 20 °C 保藏, 具体制备及鉴定方法参考文献[9]。

2.3 二乙基磷酸酯类有机磷农药 G-ELISA 分析法的建立

2.3.1 最佳抗体抗原工作浓度的确立 棋盘法测定抗原抗体最佳工作浓度。称取 DPA-OVA, 用碳酸盐缓冲溶液(CBS, pH= 9.6) 配制浓度分别为 1.0, 5.0, 10 和 20 mg/L 的抗原包被液, 每孔加 100 μL, 4 °C 包被过夜, 以磷酸盐缓冲溶液(PBST, pH= 7.4, 0.01 mol/L PBS, 含 0.05% (V/V) Tween-20) 洗板 3 次, 每次 5 min; 加 200 μL 5% 脱脂乳粉, 于 37 °C 封闭 2 h, 洗板; 加 100 μL 抗体溶液(1: 4000~ 1: 12000), 于 37 °C 温育 1 h, 洗板; 加 100 μL 酶标二抗(1: 800) 温育 1 h, 洗板; 加 100 μL TMB, 反应显色 15 min; 加 50 μL 2 mol/L H₂SO₄ 终止显色反应, 在酶标仪上测定 450 nm 的吸光度值(A_{450 nm})。选 A_{450 nm} 值接近 1 的抗原抗体浓度为最佳工作浓度。

2.3.2 交叉反应 按照建立标准曲线相同的 G-ELISA 检测条件分别对毒死蜱、对硫磷、丙溴磷、氧化乐果、除线磷、二嗪农、溴硫磷、辛硫磷、啶硫磷、三唑磷、甲胺磷、水胺硫磷、乐果、甲基对硫磷、稻丰散和马拉硫磷等多种有机磷农药进行交叉反应。将上述农药按一定浓度梯度稀释, 建立它们的抑制标准曲线, 并计算各自的 IC₅₀, 按照下述公式计算交叉反应率(Cross-reaction, CR): CR = [IC₅₀(DPA)/IC₅₀(其它农药)] × 100%。

2.4 二乙基磷酸酯类有机磷农药 BA-ELISA 分析法的建立

棋盘法测定抗原抗体最佳工作浓度。称取适量 DPA-OVA, 用 CBS 缓冲溶液(pH= 9.6) 配制浓度分别为 1.0, 5.0 和 10 mg/L 的抗原包被液, 每孔加 100 μL, 4 °C 包被过夜, PBST 溶液洗板 3 次, 每次 5 min; 加 200 μL 5% 脱脂乳粉, 于 37 °C 封闭 2 h, 洗板; 加 100 μL 多抗溶液(1: 2000, 1: 4000, 1: 8000, 1: 16000, 1: 32000, 1: 64000 和 1: 128000), 于 37 °C 温育 1 h, 洗板; 加 100 μL 生物素化二抗溶液(1: 1000), 37 °C 温育 45 min, 洗板; 加 100 μL TMB, 反应显色 15 min; 加 50 μL 2 mol/L H₂SO₄ 终止显色反应, 在酶标仪上测定 450 nm 的吸光度值 A_{450 nm}。在加入 TMB 底物溶液之前用 PBST 洗 3 次后再用二次蒸馏水洗 2 次。

2.5 样品前处理

苹果样品打浆, 取 10.0 g 添加不同浓度农药标准液后匀浆, 12000 g 冷冻离心取上清液。

3 结果与讨论

3.1 二乙基磷酸酯类有机磷农药 G-ELISA 分析法的建立

3.1.1 最佳抗原抗体工作浓度的确立 从表 1 可见, 当 A_{450 nm} ≈ 1 时, 抗原浓度为 10 mg/L、抗体稀释倍数为 1: 12000, 将此作为二乙基磷酸酯类有机磷农药间接 ELISA 分析法的最佳抗原抗体工作浓度。

表 1 ELISA 抗原抗体最佳工作浓度测定

Table 1 Measurement of proper concentration of antigen and antibody (Ag/Ab) for ELISA

抗原浓度 Concentration of coated antigen (mg/L)	抗体稀释倍数下的 A _{450 nm} A _{450 nm} for dilution folds of antibody				
	1: 4000	1: 6000	1: 8000	1: 10000	1: 12000
1	0.6354	0.4014	0.2709	0.1809	0.0939
5	0.8179	0.6119	0.3864	0.2184	0.1754
10	1.7389	1.5454	1.3499	1.1894	1.0199
20	1.8634	1.6614	1.4794	1.3304	1.1579

3.1.2 标准曲线的建立 用 PBST 缓冲溶液配制浓度为 0, 0.01, 0.10, 1.0, 5.0, 10, 50 和 100 mg/L 的 DPA 标准溶液, 绘制标准抑制曲线, 计算抑制中浓度 IC₅₀(Half maximal inhibitory concentration)。

及检出限 (IC_{10})^[10]。如图 1 所示,二乙基磷酸酯类有机磷农药 C₊ELISA 法检测建立的回归方程为 $y = 0.2207 \lg C_{DPA} + 0.5318$, $r = 0.9719$, $IC_{50} = 0.718 \text{ mg/L}$, $IC_{10} = 11.1 \text{ ng/L}$, 线性检测范围为 0.3~16 mg/L。这表明抗体对半抗原有较强的亲和力。

3.1.3 交叉反应 交叉反应发现,抗体对二乙基磷酸酯类有机磷农药毒死蜱、对硫磷、丙溴磷的交叉反应率分别为 62.3%、49.7%和 28.4%,而乐果、甲基对硫磷和马拉硫磷的交叉反应率却低于 0.1%。结果表明,以 DPA 为半抗原制备的抗体,能够实现毒死蜱等二乙基磷酸酯类有机磷农药多残留检测,这正是农药残留检测技术的发展方向之一。

通用抗体多残留检测技术对不同半抗原的响应效果存在差异。如 Xu 等^[10]在 *O*, *O*-二乙基有机磷农药多残留免疫分析检测研究中设计了 Hapten1 和 Hapten2 两种半抗原(图 2), Hapten1 和 Hapten2 对除线磷和对硫磷的检出限分别为 1734 和 4 ng/L、1598 和 39 ng/L。而国家对食品中除线磷和对硫磷的最低限量标准为 100 和 200 ng/L^[11], Hapten1 的检出限都已经超过了最低限量标准,不能达到有效控制农药残留的目的。此外,利用 Hapten2 制备的通用抗体对 12 种 *O*, *O*-二乙基有机磷农药进行多残留检测,其对蝇虫磷和毒死蜱的 LOD 分别为 0.2 和 6640 ng/L,两者相差上千倍。这说明通用抗体在制备过程中,通用抗原的制备和选择至关重要^[10-12]。其次,为实现通用抗体的农药多残留定量检测,提高检测灵敏度非常必要。

3.2 二乙基磷酸酯类有机磷农药 BA-ELISA 分析方法的建立

3.2.1 BA-ELISA 最佳抗原抗体工作浓度的建立 经生物素-亲和素放大体系测定抗原抗体最佳工作浓度结果如图 3 所示,其中横坐标为一抗溶液稀释倍数的对数值,纵坐标为显色反应后溶液的吸光度 ($A_{450 \text{ nm}}$)。结果表明,浓度分别为 1×10^3 , 5×10^3 和 $1 \times 10^4 \text{ ng/L}$ 时, $\lg(C_{ab}^0/C_{ab})$ 分别为 3.3~3.9 和 4.8~5.1 时, $A_{450 \text{ nm}}$ 值变化平稳,说明免疫反应对抗体添加量不敏感;而 $\lg(C_{ab}^0/C_{ab})$ 在 3.8~4.8 之间(对应抗体稀释倍数 $8 \times 10^3 \sim 6.4 \times 10^4$),说明免疫反应对抗体的加入量最为敏感,是适于免疫分析的抗体浓度范围,其中抗原包被浓度为 10 mg/L 的效果明显优于 1.0 和 5.0 mg/L,所以本实验选取抗原包被浓度为 10 mg/L,抗体最佳稀释倍数为 3.2×10^4 。

3.2.2 二乙基磷酸酯类有机磷农药的 BA-ELISA 检测 在 BA-ELISA 分析方法基础上,对其免疫分析条件进行了试验和筛选,在优化条件下建立了以半抗原 DPA 对数浓度为横坐标,抑制率为纵坐标的间接竞争 ELISA 标准抑制曲线和回归方程,其中抑制率 = (阴性对照孔的吸光度值 - 半抗原不同浓度孔吸光度值) / (阴性对照孔的吸光度值) $\times 100\%$ ^[13]。

不同浓度的 DPA 对抗体产生明显的梯度抑制作用(图 4),并且在 $1 \times 10^{-4} \sim 10 \text{ mg/L}$ 之间与抑制率呈现良好的线性相关性,线性回归方程为 $y = 0.1168 \lg C_{DPA} + 0.6259$, $r = 0.9889$, 计算得 $IC_{50} = 34 \text{ ng/L}$, 检出限 $IC_{10} = 0.025 \text{ ng/L}$, 这与已报道的酶标二抗体系 ELISA (线性范围为 313.8~16414.4 ng/L, IC_{50} 和 IC_{10} 分别为 717.6 ng/L 和

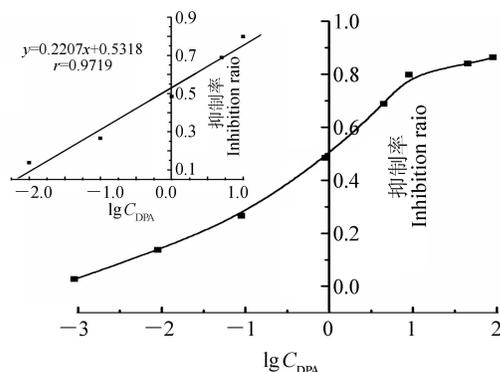


图 1 半抗原的间接竞争 ELISA 标准曲线

Fig. 1 Standard curve of hapten for indirect competitive ELISA (C₊ELISA) procedure

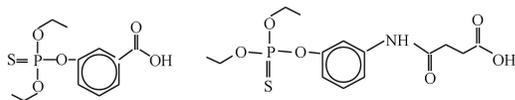


图 2 半抗原结构式^[10]

Fig. 2 Structural formula of haptens

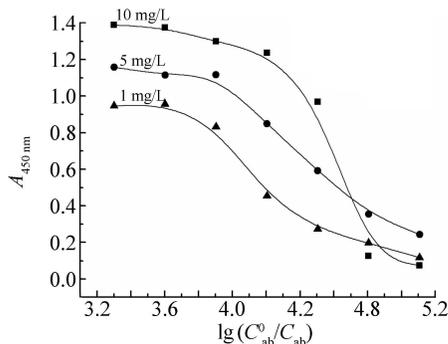


图 3 BA-ELISA 法抗原抗体最佳工作浓度测定

Fig. 3 Measurement of the proper concentration of Ag/Ab for Biotin-Avidin (BA)-ELISA procedure “ C_{ab}^0 , C_{ab} ”分别为抗体稀释前后浓度,“ C_{ab}^0/C_{ab} ”为抗体的稀释倍数 (C_{ab}^0 , C_{ab} , the concentration of antibody before dilution and diluted, C_{ab}^0/C_{ab} is the dilutionate of antibody)。

11.1 ng/L) 相比^[9], 本实验建立的生物素-亲和素放大酶联免疫吸附分析检测方法检测灵敏度提高了 20~448 倍, 检测范围也增大了几个数量级, 此外, 抗体稀释倍数从 12000 增大到 32000, 减少了实验较难获得的一抗用量, 实验中的生物素化二抗和酶标亲和素均有商品化产品, 容易购得。

3.2.3 交叉反应 按照已优化的生物素-亲和素放大酶联免疫吸附分析检测方法条件, 分别对毒死蜱、对硫磷、三唑磷、辛硫磷、乐果、马拉硫磷等有机磷农药进行交叉反应实验, 并计算交叉反应率。结果表明, 抗体对毒死蜱和对硫磷的 CR 分别为 61.82% 和 49.53%, 而抗体对三唑磷、辛硫磷、乐果、马拉硫磷等的 CR 较低, 甚至未能检出, 表明针对共性结构产生的抗体对这些结构类似的化合物能够有一定的识别能力, 这与文献[9]的结果一致, 说明生物素-亲和素放大酶联免疫吸附分析方法并没有改变抗体的特异性。

3.3 样品检测

采用所建立的方法对苹果样品进行了加标测定。由表 2 可见, 无需复杂的样品处理过程, 生物素亲和素 ELISA 方法即可对实际样品进行农药多残留分析测定, DPA 等农药的加标回收率为 70.1%~117.8%, 基本可满足痕量物质分析的要求。

表 2 样品的加标回收率及精密度

Table 2 Recovery precision test results of the apple sample

农药 Pesticide	添加水平 Addition					
	10 ng/L		100 ng/L		1000 ng/L	
	Recovery (%)	RSD (% , n= 4)	Recovery (%)	RSD (% , n= 4)	Recovery (%)	RSD (% , n= 4)
二乙基膦酸 DPA	79.4	13.8	79.1	12.1	104.9	3.5
毒死蜱 Chlorpyrifos	71.8	14.5	88.9	7.2	103.5	4.6
对硫磷 Parathion	103.0	11.1	99.8	7.4	117.8	3.7
丙溴磷 Profenofos	85.5	12.62	87.3	10.8	98.4	8.8
氧化乐果 Folimat	75.1	12.04	80.2	10.3	74.9	2.0
除线磷 Dichlofenthion	78.9	12.24	89.5	10.2	106.5	2.0
二嗪农 Diazinon	71.8	14.61	84.3	12.1	88.3	4.6
溴硫磷 Bromophos	70.9	16.91	88.1	10.0	109.7	10.4
辛硫磷 Phoxim	70.1	12.78	87.4	5.1	107.7	11.4

酶联免疫分析方法为农药残留的快速检测做出了卓越贡献, 但对提高检测灵敏度的研究少有报道^[12, 14, 15]。魏孔吉等^[16]利用生物素-亲和素放大酶联免疫吸附法测定双酚 A 含量, 与已报道的酶标二抗体系 ELISA 相比^[9], 检出限降低了 1/2, 线性范围也向低浓度推进了约一个数量级。本研究在酶联免疫方法的基础上, 以磷酸基团为抗原决定簇的有机磷农药的通用结构人工抗原, 制备能识别多种有机磷农药的抗体, 结合生物素-亲和素系统的放大作用建立直接竞争 BA-ELISA 的检测方法, 与普通 ELISA 检测比较, 检测灵敏度显著提高并扩大了检测范围。本方法在高灵敏快速农残检测中有广阔的应用前景。

References

- Sultatos L G. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*, **1994**, 43(3): 271~289
- Kima M J, Lee H S, Chung D H, Lee Y T. *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 493(1): 47~62
- Brun E M, Garces-Garvia M, Puchades R, Maquieira Á. *J. Immunol. Method.*, **2004**, 295(1-2): 21~35
- HAN Li-Jun (韩丽君). *Study on Enzyme Immuno-chemistry of Organic Phosphorus Pesticides* (有机磷农药的酶免疫化学研究). Beijing (北京), China Agricultural University (中国农业大学), **2003**: 85~87
- LI Yong-Xiang, XU Zhen-Lin, WANG Hong, LEI Hong-Tao, SUN Yuan-Ming, SHEN Dan, YANG Jie-Yi,

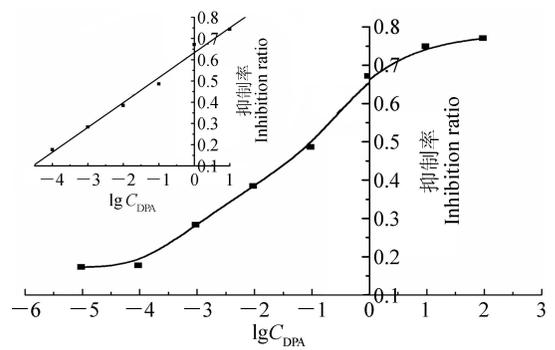


图 4 半抗原的间接竞争 BA-ELISA 标准曲线

Fig. 4 Standard curve of hapten for indirect competitive BA-ELISA procedure

- SHEN Yu-Dong(李永祥, 徐振林, 王弘, 雷红涛, 孙远明, 沈丹, 扬金易, 沈玉栋). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2010**, 38(11): 1544~ 1550
- 6 LIU Xian-Jin, YAN Chun-Rong, LIU Yuan, YU Xiang-Yang, ZHANG Cu-Zheng(刘贤进, 颜春荣, 刘媛, 余向阳, 张存政). *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), **2008**, 41(3): 727~ 733
- 7 Goldgaber D, Gibbs C J, Gajdusek D C, Svedmyr A. *J. Gen. Virol.*, **1985**, 66(8): 1733~ 1740
- 8 GAO Xiang, ZHANG Yan, FAN Ming-Tao(高翔, 张燕, 樊明涛). *Food Res. Dev.* (食品研究与开发), **2009**, 30(3): 108~ 111
- 9 ZHANG Li-Jie, ZHOU Ying-Xia, WANG Lei, PAN Ji-Rong(张丽杰, 周映霞, 王磊, 潘家荣). *Agrochemicals* (农药), **2010**, 49(3): 164~ 166, 169
- 10 Xu Z L, Xie G M, Li Y X, Wang B F, Beier R C, Lei H T, Wang H, Shen Y D, Sun Y M. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 647(1): 90~ 96
- 11 GB 5127-1998. *Maximum residue limits of dichlorophos, dimethoate, malathion and parthion in food*(食品中敌敌畏、乐果、马拉硫磷、对硫磷最大残留限量卫生标准). National Standards of the People's Republic of China(中华人民共和国国家标准)
- 12 Beier R C, Stanker L H. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 444(1): 61~ 67
- 13 YANG Li-Guo, HU Shao-Chang, WEI Ping-Hua, GUO Ai-Zhen(杨利国, 胡少昶, 魏平华, 郭爱珍). *Enzyme Immunoassay Techniques* (酶免疫测定技术). Nanjing(南京): Nan Jing University Press(南京大学出版社), **1998**: 439~ 442
- 14 Delaunay-Bertoncini N, Pichon V, Hennion M-C. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 999(1-2): 3~ 15
- 15 Shen Y D, Zhang S W, Lei H T, Wang H, Xiao Z L, Jiang Y M, Sun Y M. *Molecules*, **2008**, 13(9): 2238~ 2248
- 16 WEI Kong-Ji, ZHAO Mei-Ping, LI Yuan-Zong, CHANG Wen-Bao(魏孔吉, 赵美萍, 李元宗, 常文保). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2005**, 33(8): 1122~ 1124

Determination of Organophosphorus Pesticides Based on Biotin-Avidin Enzyme Linked Immunosorbent Assay

WANG Lei¹, ZHANG Li-Jie¹, LÜ Wei¹, HAN Shi-He^{1,2}, ZHANG Fu-Kai¹, PAN Ji-Rong^{* 1}

¹(Institute of Agro-Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Agro-Food Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Beijing 10019)

²(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062)

Abstract A multienzyme system was generated by the specific reaction between biotin and avidin. Based on the system, a biotin-avidin amplified enzyme-linked immunosorbent assay (BA-ELISA) method was developed and optimized for the determination of *O, O*-diethyl organophosphorus pesticides. Under the optimized experiment conditions, a good linear relationship between the concentrations of *O, O*-diethyl organophosphorus pesticides and inhibition ratio in the range of 0.1–1.0 × 10⁴ ng/L was obtained. The regression equation for the determination of diethylphosphonoacetic acid (DPA) was $y = 0.1168 \lg C_{DPA} + 0.6259$ ($r = 0.9889$), IC₅₀ and the detection limit were 34 and 0.0248 ng/L, respectively. Compared with the ELISA, the sensitivity and detecting range were significantly improved while the cross-reaction remained unchanged. The recovery of the spiked samples was in the range from 70.1% to 117.8%, basically meeting the requirement of trace analysis. (*O, O*-diethyl organophosphorus pesticides).

Keywords Pesticides; *O, O*-Diethyl organophosphorus; Biotin-avidin amplified enzyme linked immunosorbent assay

(Received 27 May 2010; accepted 7 November 2010)