

甲拌磷残留检测间接竞争 ELISA 试剂盒的研制

魏松红, 逢若霖, 王 翀, 纪明山, 谷祖敏, 祁之秋, 王英姿

(沈阳农业大学植物保护学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要: 研制用于检测甲拌磷残留量的间接竞争 ELISA 试剂盒。甲拌磷包被抗原的最佳工作质量浓度为 4mg/L, 抗体的最佳稀释倍数为 8000, 甲拌磷多克隆抗体交叉反应率小于 20%, 甲拌磷抑制率回归曲线为 $y=18.846x+6.9949$, 在 1~5000 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈线性关系, 检测限为 4.90 $\mu\text{g/L}$, IC_{50} 为 191.37 $\mu\text{g/L}$ 。甲拌磷试剂盒的添加回收率均高于 75%, 供试样品检测结果的批内和批间变异系数均低于 10%。试剂盒在 4℃ 或 -20℃ 下有效期为 270d。

关键词: 甲拌磷; 残留; 酶联免疫吸附测定法; 试剂盒

Development of Indirect ELISA Kit for Detecting Phorate Residue

WEI Song-hong, PANG Ruo-lin, WANG Chong, JI Ming-shan, GU Zu-min, QI Zhi-qiu, WANG Ying-zi

(College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit was developed to monitor phorate residue. The optimal concentration of coating antigen was 4 mg/L and the optimal dilution ratio of antibody was 8000. The cross-reaction ratio was less than 20%. The regression equation of inhibition rate for phorate was $y=18.846x+6.9949$ with a linear detection range of 1–5000 $\mu\text{g/L}$. Results indicated that the detection limit was 4.90 $\mu\text{g/L}$ and IC_{50} was 191.37 $\mu\text{g/L}$. The recovery rates were higher than 75%. The intra-assay and inter-assay coefficients were less than 10%. The developed kit can be stored at 4℃ or -20℃ for 270 days.

Key words: phorate; residue; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); kit

中图分类号: S482.4

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2011)04-0284-04

甲拌磷(phorate, *O,O*-二乙基-S-(乙硫基甲基)二硫代磷酸酯)是有机磷类重要的内吸性杀虫杀螨剂, 主要用于防治棉花、水稻、小麦、高粱等大田作物上的害虫^[1], 为土壤和种子处理剂, 高等毒性。甲拌磷在植物体内氧化为更高毒性的氧化物, 并有较长的残效期, 对人类的健康存在潜在威胁。因此, 对甲拌磷残留快速有效的检测方法研究具有一定意义。目前, 常见的甲拌磷检测方法为气质联用法和液质联用法^[2-3], 由于常规仪器分析方法前处理步骤复杂, 费时费力、设备昂贵, 需要专业人员操作, 不适宜大量样品和现场快速检测。以免疫化学为基础的酶联免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测方法, 具有快速、简便、灵敏、经济的特点, 适合大批量样品的检测^[4]。Jeffre 等^[5]利用 *O,O*-二乙基-O-[对-(4-羧基丁基)苯基]硫代磷酸酯作为半抗原制得广谱特异性抗体, 采用酶联免疫方法对有机磷类杀虫剂进行检测。刘贤进等^[6]采用二乙基磷酸乙酸做为通用结构半抗原制备抗血清, 对毒死蜱、辛硫磷等 12 种常见有机磷农药具有特

异性, IC_{50} 为 0.12~3.8 $\mu\text{g/mL}$ 。本实验在甲拌磷自主合成人工抗原及制备多克隆抗体的研究基础上^[7], 研制甲拌磷间接竞争 ELISA 试剂盒, 并对其性能进行测定, 适用于土壤、粮食等样品中甲拌磷残留的分析。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

甲拌磷多克隆抗体 本实验室制备; 96 孔酶标版 JET 公司; 五硫化二磷 河北世纪农药有限公司; 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 中杉金桥有限公司; 邻苯二胺(OPD) 中国五联化工厂; 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4); 洗涤液: 含体积分数 0.05% 吐温-20 的 0.01mol/L pH7.4 磷酸缓冲液; 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6); 封闭液: 含 5g/100mL 胎牛血 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4)中定容; 底物显色液: 10mg 邻苯二胺溶于 25mL 底物缓冲液中, 加入 10 μL 质量分数 30% H_2O_2 混匀; 终止液: 2mol/L H_2SO_4 溶液。

Model 680 酶标仪 美国 Bio-Rad 公司; N-1000 型

收稿日期: 2010-04-14

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: 魏松红(1974—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为农药学。E-mail: songhongw125@163.com

旋转蒸发器 日本Eyela公司。

1.2 方法

1.2.1 抗原、抗体最佳工作浓度的确定

用方阵试验法对间接竞争法 ELISA 试剂盒中抗原抗体最适工作质量浓度进行选择。0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液将包被抗原稀释成不同质量浓度后,包被酶标板,每一种包被浓度设置不同的抗体质量浓度。OD_{490nm}为1.0左右,抗体抗原用量较少,即为抗体抗原工作质量浓度^[8]。

1.2.2 丙酮溶剂对抗原、抗体结合反应的影响

间接竞争 ELISA 法检测过程中,加入甲拌磷多克隆抗体之前分别添加体积分数为5%、10%、20%和30%丙酮的0.01mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.4),以不加丙酮为对照,每个处理3次重复,计算抑制率,判断丙酮含量对抗原、抗体结合反应的影响程度,确定丙酮含量。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{\text{OD}_{490\text{nm}}(\text{未加丙酮}) - \text{OD}_{490\text{nm}}(\text{加丙酮})}{\text{OD}_{490\text{nm}}(\text{未加丙酮})} \times 100$$

1.2.3 抗体的特异性检测

交叉反应率是指抗体与结构不同的抗原决定簇发生结合的能力,反映了抗体的特异性。利用竞争性抑制试验方法,分别测定抗体与甲拌磷及结构类似物抑制率,以交叉反应率高低比较抗体的特异性^[9]。

$$\text{交叉反应率}/\% = \frac{\text{抑制率为50\%的甲拌磷质量浓度}}{\text{抑制率为50\%的其他待测农药质量浓度}} \times 100$$

1.2.4 试剂盒内容及操作方法

试剂盒内容:96孔酶标板(甲拌磷包被抗原包被,2.5%胎牛血清封闭);甲拌磷多克隆抗体1瓶,1mL;酶标二抗(辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG)1瓶,200μL;底物邻苯二胺(OPD)1支,50mg;30%过氧化氢1瓶,每瓶2mL;反应终止液1瓶,10mL;底物缓冲液1瓶,每瓶10mL;0.01mol/L pH7.4磷酸缓冲液1瓶,每瓶30mL;洗涤液1瓶,每瓶30mL,于-20℃下保存待用。

操作方法:取出一块包被有甲拌磷包被抗原且封闭好的酶标板,恢复室温后备用;加入50μL标样或处理好的样品到各孔中;加入甲拌磷多克隆抗体,每孔50μL,37℃孵育1h;倒出孔中的液体,用100μL稀释好的洗涤液洗3次;加入50μL稀释的酶标二抗,37℃孵育1h;倒出孔中的液体,用100μL洗涤液洗3次;加入底物显色液100μL,并在37℃避光显色30min;加入50μL反应终止液,混合好后在490nm波长处测定OD值。

1.2.5 试剂盒的结果判定

配制1、10、50、100、200、500、1000、2000、5000μg/L的甲拌磷溶液,在加入甲拌磷多克隆抗体前分

别添加到酶标板中,每个质量浓度重复3次,分别以空白和不加甲拌磷溶液为对照,采用间接竞争 ELISA 法进行检测。以甲拌磷溶液质量浓度对数为横坐标,抑制率为纵坐标,即得其标准曲线,由图即可得其灵敏度。抑制率计算公式为:

$$\text{抑制率}/\% = \frac{(\text{OD}_{\text{max}} - \text{OD}_{\text{min}}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\text{min}})}{\text{OD}_{\text{max}} - \text{OD}_{\text{min}}} \times 100$$

式中:OD_{max}为不加农药时的光密度;OD_x为加农药时的光密度;OD_{min}为空白对照的光密度。

1.2.6 试剂盒的回收率、精密度和有效期测定

1.2.6.1 样品的前处理

将水稻植株、小麦植株样品切碎,水稻种子、小麦种子、土壤样品直接称量,每份20g分别装入三角瓶中。添加甲拌磷到样品中,每个质量浓度重复3次。在样品中加入90mL丙酮提取5min。提取液用布氏漏斗抽滤,用10mL丙酮冲洗滤渣,用二氯甲烷萃取,无水硫酸钠进行干燥后,用旋转蒸发器浓缩近干,丙酮定容至1mL,进行ELISA分析^[9]。

1.2.6.2 加标回收实验

分别取10、100、1000μg/kg的甲拌磷标样添加到样品中,用间接竞争 ELISA 法测定,根据标准曲线计算出检测的甲拌磷质量浓度,计算添加回收率与变异系数。

1.2.6.3 精密度实验

分别取10、100、1000μg/kg甲拌磷添加到样品中,用间接竞争 ELISA 法测定其批内和批间变异系数。

1.2.6.4 试剂盒有效期

取同一批次试剂盒分别保存于4℃和-20℃,0、30、60、90、120、150、180、210、240、270d时,使用试剂盒测定添加到土壤中的甲拌磷,通过结果判断试剂盒的有效性。

2 结果与分析

2.1 抗原抗体的最佳工作质量浓度

表1 间接 ELISA 法中抗原、抗体最适工作质量浓度方阵试验结果

Table 1 Optimal concentrations of antigen and antibody during indirect ELISA assay

抗血清 稀释倍数	包被抗原质量浓度/(mg/L)					
	0.5	1	2	4	6	8
1000	1.968	2.036	2.102	2.345	2.347	2.813
2000	1.395	1.556	1.772	1.917	2.124	2.695
4000	1.074	1.175	1.239	1.618	1.890	2.033
8000	0.756	0.896	0.968	1.026	1.121	1.253
16000	0.536	0.694	0.721	0.903	0.973	1.132
32000	0.364	0.518	0.618	0.762	0.812	0.913

经方阵实验结果(表 1), OD_{490nm} 为 1.026 时对应的包被抗原和抗体的质量浓度为最适工作质量浓度, 即甲拌磷包被抗原的最佳工作质量浓度为 4mg/L, 抗体的最佳稀释倍数为 8000 倍。

2.2 丙酮体积分数对抗原、抗体结合反应的影响

由表 2 可以看出, 随着丙酮比例加大, 对显色反应的抑制逐渐增大, 丙酮体积分数 5% 时对抗原抗体结合能力影响最小, 选定丙酮体积分数为 5%。

表 2 丙酮含量对抗原、抗体结合反应的影响
Table 2 Effect of acetone concentration on conjugation between antigen and antibody

丙酮体积分数 /%	OD _{490nm}				抑制率 /%
	I	II	III	平均值	
0	1.235	1.264	1.270	1.256	—
5	1.151	1.182	1.246	1.193	5.0
10	0.831	1.053	0.986	0.957	23.8
20	0.726	0.717	0.754	0.732	41.7
30	0.607	0.553	0.590	0.583	53.6

2.3 抗体特异性检测结果

甲拌磷多克隆抗体对结构类似的相关化合物进行交叉反应实验, 结果表明该试剂盒与绝大多数有机磷农药没有强烈的交叉反应, 与所测有机磷农药的交叉反应率均小于 20%(表 3)。

表 3 抗甲拌磷抗体的特异性实验
Table 3 Specificity experiments of anti-phorate antibody

类似物	甲拌磷	乐果	氧化乐果	对硫磷	毒死蜱	敌敌畏	敌百虫
IC ₅₀ /(μg/L)	355	1860	2810	3670	3200	4100	4500
交叉反应率 /%	100	19.09	12.63	9.67	11.09	8.66	7.88

2.4 试剂盒标准曲线及灵敏度

采用间接竞争 ELISA 法, 以标准甲拌磷溶液质量浓度对数(lg C)为横坐标, 抑制率为纵坐标, 即得其标准曲线: $y = 18.846x + 6.9949$, 甲拌磷质量浓度在 1~5000 μg/L 范围内呈线性关系, 相关系数 $R^2 = 0.9401$, 最低检测限为 4.90 μg/L, IC₅₀ 为 191.37 μg/L。

2.5 加标回收实验结果

用甲拌磷间接竞争 ELISA 试剂盒测定 5 种不同的样品的添加回收率(表 4), 结果表明添加回收率均高于 75%, 变异系数小于 10%, 说明本方法准确可靠。

表 4 ELISA 试剂盒测定样品中甲拌磷添加回收率实验结果
Table 4 Recovery rate experimental results of samples spiked with phorate determined by ELISA kit

样品	添加量 /(μg/kg)	测定结果平均值 /(μg/kg)	回收率 /%	变异系数 /%
土壤	10	7.665	76.65	8.45
	100	77.29	77.29	7.86
	1000	786.17	78.61	6.34
小麦植株	10	7.998	79.98	6.79
	100	77.26	77.26	7.48
	1000	761.61	76.16	6.26
小麦种子	10	8.639	86.39	9.62
	100	77.64	77.64	8.35
	1000	769.27	76.92	7.26
水稻植株	10	7.768	77.68	5.96
	100	79.13	79.13	8.61
	1000	769.12	76.91	7.34
水稻种子	10	8.647	86.47	6.49
	100	87.16	87.16	8.36
	1000	867.97	86.79	9.13

注: 重复数(N)=3。

2.6 精密度实验结果

用甲拌磷间接竞争 ELISA 试剂盒测定 5 种不同样品的添加量来衡量其精密度(表 5), 结果表明试剂盒的批内变异系数在 4.18%~7.81% 之间, 小于 8%, 批间变异系数在 6.17%~8.39% 之间, 小于 9%, 说明该试剂盒精密度很好。

表 5 ELISA 试剂盒测定样品中甲拌磷的精密度实验结果
Table 5 Precision experimental results of phorate determination in samples by ELISA kit

样品	添加量 /(μg/kg)	测定结果平均值 /(μg/kg)	批内变异系数 /%	批间变异系数 /%
土壤	10	8.261	5.61	5.94
	100	83.24	6.01	6.26
	1000	800.91	5.82	6.41
小麦植株	10	71.94	7.26	8.39
	100	72.34	7.81	7.89
	1000	795.52	7.54	8.36
小麦种子	10	7.929	5.43	6.32
	100	78.65	4.18	6.75
	1000	773.59	5.27	7.16
水稻植株	10	7.464	6.29	8.45
	100	74.20	6.58	8.72
	1000	759.65	6.13	8.32
水稻种子	10	7.816	4.94	6.17
	100	77.18	5.34	6.59
	1000	76.89	5.01	6.48

注: 重复数(N)=3, 批数(N)=3。

2.7 试剂盒有效期实验结果

表 6 抗体有效期实验结果
Table 6 Experimental results of valid period of ELISA kit

时间 /d	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270
添加量 /(μg/kg)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
测定结果平均值 /(μg/kg) (4℃)	8.261	8.137	8.310	8.275	8.036	7.813	7.629	7.906	7.601	7.862
测定结果平均值 /(μg/kg) (-20℃)	8.307	8.219	8.196	8.203	8.164	8.073	7.844	8.024	7.971	7.859

经甲拌磷间接竞争 ELISA 试剂盒测定土壤中添加样品含量, 结果表明试剂盒在 4℃ 和 -20℃ 条件下保存至 270d 有效(表 6)。

3 结 论

本研究在自主合成甲拌磷半抗原, 并免疫制得甲拌磷多克隆抗体的基础上^[7], 研制了一种适用于检测样品中甲拌磷残留的间接竞争 ELISA 试剂盒, 并对试剂盒的灵敏度、特异性、精密度、准确度和有效期进行测定。研制的试剂盒检测限为 4.90 μg/L, IC₅₀ 为 191.37 μg/L, 线性检测范围 1~5000 μg/L, 交叉反应率小于 20%, 供试样品检测结果的批内、批间变异系数均低于 10%, 回收率均高于 75%, 试剂盒在 4℃ 或 -20℃ 下至少可保存 270d, 试剂盒稳定性较好。目前, 甲拌磷在粮食作物上不允许残留, 本研究研制的试剂盒可通过加强免疫, 提高抗血清的效价, 进一步提高灵敏度, 使其更好地应用到环境及食品中的甲拌磷残留检测。

参考文献:

- [1] 刘乾开, 朱国念. 新编农药使用手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 60-62.
- [2] 周珊, 赵立文, 雒丽娜. GC-MS-MS 测定蔬菜中八种有机磷农药[J]. 环境化学, 2005, 25(6): 683-687.
- [3] ZAVITSANOS P, YANG P, GREY L. 液相/质谱(LC/MS)技术用于有机磷农药分析[J]. 环境化学, 2002, 21(1): 92-95.
- [4] 梁赤周, 桂文君, 朱国念, 等. 三唑磷残留检测直接竞争 ELISA 试剂盒的研制及应用[J]. 中国食品学报, 2008, 8(6): 102-108.
- [5] JEFFRE C, JEANETTE M, DIANE R, et al. Development and evaluation of antisera for detection of the *O,O*-diethyl phosphorothionate and phosphorothionothiolate organophosphorus pesticides by immunoassay[J]. Agric Food Chem, 1998, 46(8): 3116-3123.
- [6] 刘贤进, 颜春荣, 刘媛, 等. 有机磷杀虫剂通用结构半抗原的设计及广谱特异性抗体的制备[J]. 中国农业科学, 2008, 41(3): 727-733.
- [7] 王翀, 魏松红, 李兴海, 等. 甲拌磷人工抗原的合成及多克隆抗体的制备[J]. 河南农业科学, 2009(3): 56-59.
- [8] 杨挺. 克百威的 ELISA 试剂盒及多克隆抗体解毒功能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2002.
- [9] 陈丙坤, 张中明, 聂果, 等. 甲拌磷在小麦植株、籽粒及土壤中的分析方法[J]. 农药科学管理, 2005, 26(4): 15-17.