

对硫磷快速 ELISA 检测方法的建立

芮玉奎 王 茜 黄昆仑 郭 晶 罗云波

(中国农业大学食品科学与营养工程学院,农业部农产品质量监督检验测试中心 北京 100083)

摘 要:由于对硫磷的残留问题及其危害,迫切需要建立一种快速有效的农药检测方法。将对硫磷苯环上的硝基还原为氨基,得到了具有氨基活性的半抗原化合物——氨基对硫磷,然后采用重氮法将氨基-对硫磷与牛血清白蛋白(BSA)或卵清白蛋白(OVA)相偶联,分别合成了免疫原和包被抗原:氨基对硫磷-BSA、氨基对硫磷-OVA。对合成的抗原进行紫外可见扫描,确证偶联成功。用合成的免疫抗原免疫实验用大白兔,制备对硫磷的多克隆抗血清,效价达到 1.1×10^6 以上。对硫磷抗体除了与甲基对硫磷具有极其微弱的交叉反应以外,与甲胺磷和毒死蜱交叉反应低于 0.1%,最低检测限 2.0 ng/g,回收率为 93.3%。该方法简便、快速、灵敏,适用性强。

关键词:对硫磷;酶联免疫吸附测定;农药残留量

Modified ELISA for quantitation of parathion in agricultural products

RUI Yu-kui, WANG Qian, HUANG Kun-lun, GUO Jing, LUO Yun-bo

(College of food science and nutritional engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: A quick and effective method to dispose the problem of excessive pesticide residues in agricultural products was reported. Parathion was conjugated by diazotization with OVA and BSA to prepare connective antigen (OVA-parathion) and immune antigen (BSA-parathion). They were then identified by ultraviolet radiation scanning and electrophoresis, and the immune antigen was injected into New Zealand rabbit to obtain the polyclonal antibody, whose efficiency value was 1.1×10^6 . The crossover reaction of the antibody against methyl-parathion was 0.98%, and against methamidophos and chlorpyrifos was < 0.1%. The detection limit was 2.0 ng/g. This method have comparable to (even exceeded) the method using the test kit.

Key word: Parathion; Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay; Pesticide Residues

随着现代农业的发展,农药一方面在农业生产中发挥着越来越重要的作用,另一方面,由于农药的不合理使用也导致了严重的农药残留超标问题,影响人们的身体健康和农产品出口贸易。长期大量地使用农药,还会对生态系统的结构和功能造成严重危害。我国出口的农产品也因农药残留超标而屡屡发生被拒收、扣留、退货、索赔和撤消合同等事件,造成了巨大的经济损失^[1]。

有机磷农药能与人体内乙酰胆碱酶结合,使人体胆碱酶失去活性而丧失对乙酰胆碱的分解能力,导致体内乙酰胆碱酯的蓄积,使神经传导功能紊乱。其危害主要包括以下方面:对神经的影响;致癌作用;对肝脏的影响。其中对硫磷危害最大^[2,8]。

针对日益严重的农药残留问题,除了需要认真宣传贯彻国家有关农业环境保护、农药管理、无公害

农产品管理等有关的法律法规,积极创建无公害农产品生产示范基地、绿色食品生产基地,推广无公害农产品生产技术,提高农产品卫生质量,加强农药管理外,还需要对农产品中农药残留量及时、准确地分析检测,以监控农药的合理使用,防止农药残留超标的产品上市销售。目前国内农药的检测标准是仪器检测,检测过程繁琐、成本高、效率低,所以建立快速、有效的检测方法是当务之急。

1 材料与方法

1.1 材料 对硫磷标准样品(纯度 99.0%)购自农业部药检所;牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司;其它试剂均为分析纯。新西兰白兔 2 kg, 3 月龄,由中国农业大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 对硫磷抗原合成 参考文献^[3,4,6,10]方法并加以改进。将对硫磷 0.5 g 溶于 5 ml 乙醚中,倒入

作者简介:芮玉奎 男 博士 讲师

通讯作者:罗云波 男 教授 博士生导师

分液漏斗后,用 2 ml 冷的 1% Na_2CO_3 溶液萃取。向上层溶液中加入 5 ml 乙酸 - 盐酸溶液(体积比为 9+1),分多次加入锌粉 1 g。黄色反应混合物升温搅拌回流反应 45 min;冷却,过滤,并用四氧化碳洗涤沉淀,合并滤液,加四氧化碳萃取 2 次,滤液用 3 ml 的双蒸水萃取。静置分层后除去上层,下层用无水 Na_2SO_4 除水。次日,过滤后,氮气吹干,得棕色油状氨基 - 对硫磷。取氨基 - 对硫磷 105 mg 溶于含有 2 mmol 盐酸的 50 ml 蒸馏水中,冷却,缓慢滴加冷的 0.1 mol/L NaNO_2 溶液至淀粉碘化物试纸变蓝,再换成冰浴,继续搅拌 30 min 后,加入适量的尿素以除去过量的亚硝酸。称取 BSA 500 mg 溶于硼酸盐缓冲液(pH=9)100 ml,混合 2 溶液,冰浴反应 2 h,反应液逐渐呈橙色透明状,将反应物装入透析袋后,用 4 L 的双蒸水在 4℃ 下透析 5 d,每天更换双蒸水 4 次,透析产物为氨基 - 对硫磷 - BSA 免疫抗原。包被抗原氨基 - 对硫磷 - OVA 的合成同上。

1.2.2 免疫抗原的鉴定^[3,6,10] 取 3 ml 对硫磷溶液(0.5 mg/ml),3 ml BSA 溶液(0.5 mg/ml)和 3 ml 免疫抗原(相当于 0.5 mg/ml 蛋白),以 PBS 为空白对照,在紫外可见分光光度计上扫描其吸收光谱线。包被抗原(OVA-parathion)的鉴定方法与免疫抗原相同。(见图 1)

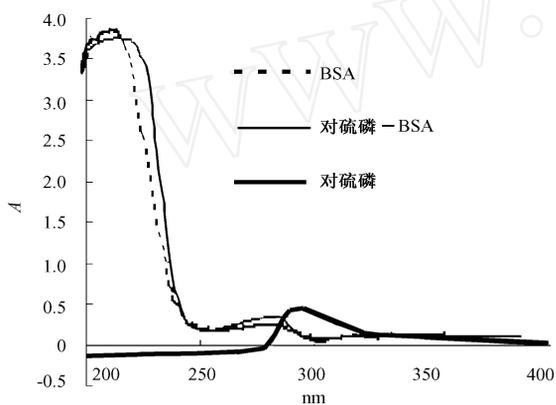


图 1 BSA、对硫磷 - BSA、对硫磷的紫外可见扫描图谱

1.2.3 免疫方案 选择 3 月龄、体重 2 kg 的新西兰白兔,将免疫抗原用生理盐水稀释到 1.0 mg/ml,吸入 1 ml 到注射器中,加入等量的弗氏完全佐剂(第 1 次免疫)或弗氏不完全佐剂(第 2 到第 5 次免疫),通过医用 3 通阀将抗原和佐剂充分混合乳化。第 1 次、第 2 次、第 3 次、第 4 次和第 5 次背部皮下多点免疫;第 6 次直接用免疫抗原 0.3 ml 耳静脉注射免疫。

1.2.4 效价测定 在加强免疫前或动脉取血前,在兔子耳部静脉取血(0.2~0.5 ml),放置在 4℃ 冰箱中过夜。第 2 天取出,4 000 r/min 离心,取血清用于效价测定,测定方法参照于秋香方法^[4]。

1.2.5 试样测定 参照文献方法^[4,7,9]。包被:按一定比例稀释包被抗原,加入酶标板,每孔 100 μl ,37℃ 温育 3 h,洗板 1 min,重复 4 次。竞争性反应:前 3 排加入标样做标线,每个浓度做 3 个平行。其余每孔加 50 μl 试样,每个试样做 3 个平行,然后加入抗体。于湿盒中 37℃ 下保温 30 min。洗板:1 min,重复 4 次。加二抗:每孔加入羊抗兔抗体 100 μl ,放入湿盒中 37℃ 保温 30 min,洗板 1 min,重复 4 次。加底物显色:每孔加入底物显色液 100 μl ,湿盒中保温,显色适当后(即最高浓度孔 A 值在 1.5 以上),每孔加入 50 μl 4 mol/L 硫酸终止反应。比色:在酶联免疫分光光度计测定 490 nm 处的 A 值。计算:根据 A 值在标线上查出各孔的值,即为该试样的浓度 c , $c \times V$ /重量即为单位重量试样中对硫磷的含量。气相色谱(GC)方法参照文献^[4]

2 结果及讨论

2.1 免疫抗原的验证 在大分子和小分子(肽类除外)偶联物中,2 种分子均含有各自不同的紫外可见吸收峰,但在偶联物紫外可见扫描光谱中表现各自光谱图迭加的性质。用紫外可见光谱扫描对硫磷、对硫磷 - BSA、BSA,三者的紫外扫描图谱出现明显交叉,说明对硫磷和 BSA 连接成功(见图 1)。

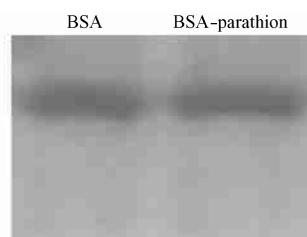


图 2 3.864 mg/ml 电泳图谱

根据电泳法从蛋白质的分子量的差异也可以判断是否对硫磷与 BSA 连接成功,如果连接上了,则分子量就要大一些,电泳时的谱带上就会有所差异,采用 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳,SDS 可以使蛋白质排除分子形状,电荷等因素,而使电泳只与蛋白质的分子量有关,图 2 为电泳的图谱,可见第 3 条图谱明显高于第 1 条和第 2 条图谱,这就说明这两者之间存在差异,且分子量大的图谱就会比较高。

2.2 效价测定 从表 1 中可以看出,抗 parathion 抗血清在 $1:1 \times 10^6$ 的稀释度时,吸光度值大于 1.0,因此,抗体的工作效价大于 1×10^6 。但是为了使得实验数据更加准确,建议用 $1:2 \times 10^5$ 倍来稀释抗体。

2.3 交叉反应 由表 2 可以看出,对硫磷抗体除了与甲基对硫磷具有极其微弱的交叉反应以外,与甲

表1 抗parathion抗血清的吸光值 A

稀释倍数	1/1 ×10 ⁷	1/1 ×10 ⁶	1/1 ×10 ⁵	1/1 ×10 ⁴	1/1 ×10 ³	1/1 ×10 ²
待检血清	0.33	1.32	1.87	2.57	3.15	3.37
对照血清	0.05	0.12	0.08	0.19	0.25	0.31

胺磷和毒死蜱交叉反应低于 0.1%，说明实验所得对硫磷抗体具有很强的特异性。

表2 对硫磷抗体与其它有机磷农药的交叉反应 %

农药名称	交叉反应率
对硫磷	100.00
甲基对硫磷	0.98
甲胺磷	<0.10
毒死蜱	<0.10

2.4 校正曲线 图3是以试样A值与对照试样A值的比值为Y轴,以甲胺磷标准品浓度的对数值为X轴做的校正曲线,相关系数为 $R^2 = 0.9858$ 。最低检测限在 2.0 ng/g。

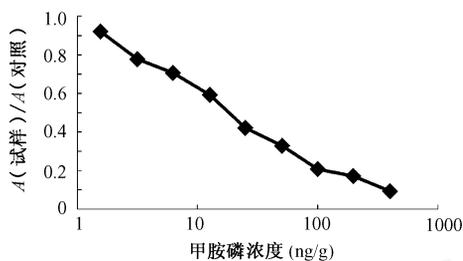


图3 甲胺磷检测校正曲线

2.5 ELISA方法回收率测定及与GC方法的比较 由表3可以看出,ELISA和GC方法在加入对硫磷纯品较少时,测定结果相差不大。随着纯品的增加,ELISA方法测定的误差有所增加,当添加纯品为1000 ng时,ELISA方法测定的结果仅为862 ng,与GC测定的结果(973 ng)相差较大,但是鉴于在国家食品卫生标准中要求的残留限量很低(一般低于0.1 μg/g),所以本实验建立的ELISA方法符合国家标准要求。在试样中分别加入50、200、1000 ng不同浓度的对硫磷标准样品进行测定,回收率分别是95.7%、98%和86.2%(表3),平均回收率为93.3%。

目前国内外广泛使用的测定对硫磷残留量的方法大多是色谱法,这些方法不仅需要昂贵的仪器,而且需要繁琐的样品净化程序,不适合在基层推广应用。免疫检测技术具有简便、快速、灵敏的特点,因

此近十多年来在食品中农药残留检测方面取得了迅速的发展。

表3 ELISA与GC法的比较

添加对硫磷纯品的量 (ng)	气相色谱测定值 (ng)	ELISA测定值 (ng)	ELISA回收率 %
50	47	45	95.7
200	181	186	98.0
1000	973	862	86.2

要更加快速、准确地测定农产品中农药的残留,仅仅建立ELISA方法还是不够的。试剂盒的检测极限还有降低的空间,今后我们还要在多种农药的同时检测、降低检测限和寻找更快速的检测方法(试纸条)方面做更多的工作。

参考文献

- [1] 孙鑫贵,吴国华,薛颖,等.北京市蔬菜、水果中有机磷农药残留现状调查[J].中国食品卫生杂志,2003,15(6):536-538.
- [2] 朱秋鸿,黄金祥.急性有机磷中毒所致非神经系统损害[J].中国工业医学杂志,2003,16(3):171-173.
- [3] 郭剑平,刘云霞,高增林,等.对硫磷人工抗原合成及其鉴定[J].中国公共卫生,2003,19(9):1069-1072.
- [4] 于秋香.对硫磷残留的酶联免疫技术的研究[M].北京:中国农业大学,2003.
- [5] 赵维佳,高巍,陈如东,等.青菜中多种农药残留量的分析方法[J].南京农业大学学报,2004,27(1):105-107.
- [6] Min Jung Kim, Hye-Sung Lee. Synthesis of haptens of organophosphorus pesticides and development of enzyme-linked immunosorbent assays for parathion-methyl [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 47-62.
- [7] Van Emon J, Lopez-Avila V. Immunochemical methods for environmental analysis [J]. Analytical Chemistry, 1992, 64(2):79-88.
- [8] Roberts, David Knet. Comparative methyl parathion toxicity between three feral rodent species and their laboratory animal counterparts [Z]. Texas A and M University, 1986.
- [9] Jung F, Gee S J. Utility of immunochemical techniques for the analysis of pesticides [J]. Pestic Sci, 1989, 26:303-317.
- [10] Erecegovich C D, Vallejo R P, Getting R P, et al. Development of a radioimmunoassay for parathion [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1981, 29, 559-568.

[收稿日期:2005-04-01]

中图分类号:R15;S482.33;S481.8 文献标识码:B

文章编号:1004-8456(2005)04-0315-03