

· 研究论文 ·

对硫磷 ELISA 异源分析模式比较研究

刘毅华¹, 王春梅¹, 毕金程¹, 黄国洋², 朱国念^{*1}

(1. 浙江大学 农药与环境毒理研究所, 杭州 310029; 2 浙江省农药检定管理所, 杭州 310020)

摘要:为探讨方法模式对异源 ELISA 法各分析参数的影响情况及影响机理,设计并合成了 4 种与对硫磷结构相似的竞争半抗原,通过建立不同模式的同源与异源 ELISA 分析法,比较了不同模式下的抗原抗体用量、灵敏度、检测限及不同样品添加回收率。结果表明,异源分析对抗原和抗体的用量比同源分析有所增加,但异源分析可大大提高方法的检测灵敏度。在异源分析中,直接竞争包被抗原的 ELISA (CC 模式)方法重现性较差;直接竞争包被抗体的 ELISA (AC 模式)抗原抗体用量最多,检测灵敏度较低;间接竞争 ELISA 法 (IC 模式)具有较好的检测灵敏度,抗环境和基质干扰的能力较强,为异源 ELISA 分析中较优的模式。

关键词:对硫磷;异源分析;ELISA;农药残留

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1008-7303(2008)03-0315-07

Comparative Study of Three ELISA Formats for Heterologous Assay of Parathion

LIU Yi-hua¹, WANG Chun-mei¹, BI Jin-cheng¹, HUANG Guo-yang², ZHU Guo-nian^{*1}

(1. Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

2. Institute for the Control of Agrochemicals, Zhejiang Province, Hangzhou 310020, China)

Abstract: Four competitors which simulate parathion molecule were designed and synthesized, followed by testing the effect of assay format on the heterologous ELISA. Three types of assay formats, named the conjugate-coated (CC) format, antibody-coated (AC) format and indirect competitive (IC) format, were applied in the homologous or heterologous ELISA. Some factors, such as dosages of haptens and the antibody mentioned above, IC₅₀ value and limit of detection of parathion, and recoveries of ELISA in different samples were compared to find the best assay format. The results showed that the used dosage of hapten and antibody in the heterologous ELISA were higher than that in the homologous ELISA, the heterologous ELISA greatly improved the sensitivity. Moreover, in the heterologous ELISA, the CC format had a relatively low reproducibility. While the AC format had the highest dosage of hapten and antibody in the three types formats, but had low sensitivity. It is found that the IC format had a preferable sensitivity and stable resistance to matrix effects. In conclusion, the IC format was the most suitable one in the heterologous ELISA.

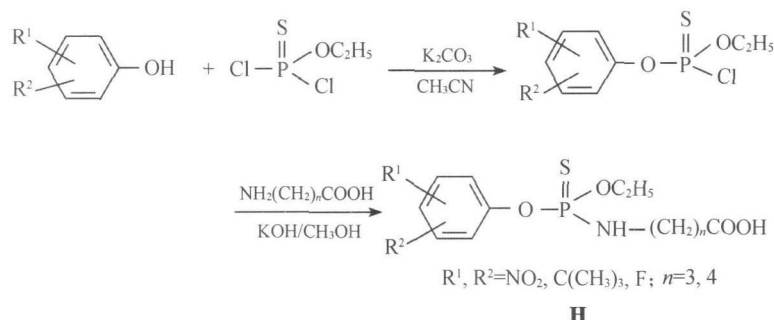
Key words: parathion; heterologous assay; ELISA; pesticide residue

收稿日期:2008-04-08;修回日期:2008-05-29.

作者简介:刘毅华(1981-),女,湖南永州人,博士,主要从事农药免疫化学分析研究, E-mail: liuyihua 813@yahoo.com.cn; *通讯作者 (Author for correspondence):朱国念(1957-),男,浙江诸暨人,博士,教授,主要从事农药残留检测和毒理学研究. 联系电话:0571-86971220; E-mail: zhugn@zju.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金项目(30370944);教育部博士点基金项目.

农药残留检测是保障农产品质量安全的重要环节,也是发达国家设置贸易壁垒的重要技术手段。基于抗原-抗体分子识别的免疫分析技术,特别是酶联免疫吸附测定方法(ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)对于特异、灵敏、简便、快速、在线检测农产品中的农药残留具有其独特优势^[1,2]。ELISA分析法根据免疫半抗原与竞争半抗原结构的异同可分为同源分析(homologous assay,用同一种半抗原制备的人工抗原与相应的抗体进行免疫分析)与异源分析(heterologous assay,用同一种分析物的不同半抗原所得的抗体分别与不同半抗原制备的包被抗原或标记抗原进行的免疫分析),越来越多的研究^[3-6]表明,异源分析可大大提高方法的检测灵敏度。根据包被物(包被抗原、抗体或二抗)、包被方式、加入的前后顺序等方面的不同,不论是同源还是异源ELISA都有多种分析模式。不同模式具有不同的方法灵敏度、最大吸光值、抗原抗体用量及反应时间,尤其灵敏度的差异是判定ELISA分析方法性能的关键。目前国外有关ELISA分析方法模式选择的报道较少^[7-9],国内尚未见相关报道,已有的研究报道也基本集中在同源ELISA分析模式比较上。ELISA分析方法,特别是异源分析方法模式的比较研究对优化ELISA方法、探讨抗体识别机制都具有重要意义。笔者以对硫磷为例,在已获得高特异性多克隆抗体^[10]的基础上,采用4种竞争半抗原分别建立同源与异源的ELISA分析法,进而对常用的3种ELISA模式进行了比较研究。



以5-[乙氧基-(4硝基苯氧基)硫代磷酰氨基]戊酸(H1)的合成为例。将O-乙基硫代磷酰二氯5.24 g(27.8 mmol)溶于20 mL乙腈中,加入20 g碳酸钾,搅拌下逐滴加入15 mL溶有3.0 g(21.6 mmol)对硝基苯酚的乙腈溶液,室温搅拌反应1 h,抽滤,浓缩,硅胶柱分离纯化(石油醚:乙酸

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

对硫磷(parathion)标准品(纯度99%)购自农业部农药检定所;抗对硫磷抗体(H1-Ab),为用H1-BSA免疫兔子获得的抗体,BSA为牛血清蛋白,该抗体为浙江大学农药与环境毒理研究所实验室优选的抗对硫磷多克隆抗体^[10]。

卵清蛋白(OVA)、辣根过氧化物酶(HRP)及酶标二抗(山羊抗兔IgG-HRP),上海华美生物工程公司;磷酸盐缓冲液(PBS)(0.01 mol/L, pH 7.4);碳酸盐缓冲液(CBS)(0.05 mol/L, pH 9.6);洗涤液(PBST)(0.01 mol/L, pH 7.4, PBS-0.05%吐温-20);封闭液(含质量分数为2%牛奶的PBS溶液);底物液[A液,称取过氧化脲1.0 g, N₂HPO₄·12H₂O 35.8 g, 柠檬酸·H₂O 10.3 g, 吐温-80 100 μL, 用蒸馏水定容至1 000 mL; B液:称取3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB) 700 mg, 溶于40 mL二甲基亚砜(DMSO)中,加入10.3 g的柠檬酸·H₂O充分溶解,用蒸馏水定容至1 000 mL, 4℃保存。用时将A液和B液等体积混匀];终止液(2 mol/L H₂SO₄)。

酶标仪(BIO-RAD 550型),自动酶标洗板机(DEM-型,北京拓普分析仪器有限公司),移液枪,96孔聚苯乙烯酶标板(美国COSTAR)。

1.2 实验方法

1.2.1 竞争半抗原的合成 参照Kim等^[11]的方法合成了4种竞争半抗原(H1~H4)。合成路线如下:

=8 1, 体积比)得5.47 g(收率90%)淡黄色油状物;取该油状物500 mg(1.78 mmol)溶于3 mL甲醇中并置于冰盐浴中冷却,搅拌下滴加2 mL溶有249 mg(4.45 mmol)氢氧化钾和229 mg(1.96 mmol)5-氨基戊酸的甲醇溶液,冰浴搅拌反应1 h,抽滤,浓缩,硅胶柱分离纯化(石油醚:乙

酸乙酯-甲酸 = 90 : 10 : 1) 得 546 mg (85%) 淡黄色油状物, 即竞争半抗原 H1。用类似方法合成了其余的竞争半抗原 H2、H3、H4。其结构均经 $^1\text{H NMR}$ 确认。

1.2.2 酶标半抗原与酶标抗体的制备 酶标半抗原制备采用混合酸酐法^[12]。将 0.1 mmol 对硫磷半抗原 (H1、H2、H3、H4) 溶于 1 mL DMF 中, 搅拌下加入 25 μL 三正丁胺和 12 μL 氯甲酸异丁酯, 室温反应 1 h; 取反应液 100 μL 加入到 3 mL 溶有 15 mg HRP, 浓度为 0.01 mol/L、pH 9.6 的 CBS 溶液中, 磁力搅拌 4 h; 待反应完成后, 透析, 分装, 4 $^\circ\text{C}$ 保存备用。

酶标抗体 (H1-A b-HRP) 的制备采用改良的过碘酸钠法^[12]。将 10 mg HRP 溶于 1 mL 蒸馏水中, 加入新配制的 0.06 mol/L 的过碘酸钠溶液 1 mL, 混匀置于冰箱 30 min, 取出后加入 0.16 mol/L 的乙二醇水溶液 1 mL, 于室温放置 30 min 后加入含 20 mg H1-A b 抗体的水溶液 4 mL, 混匀后透析过夜, 从透析袋中取出后加 5 mg/mL 的 NaBH_4 溶液 0.7 mL, 混匀置于冰箱中 2 h, 加等体积饱和硫酸铵溶液, 4 $^\circ\text{C}$ 下静置 1 h, 3 000 r/min 下低温离心 30 min, 弃上清液。将沉淀用 0.02 mol/L pH 7.4 的 PBS 溶液溶解, 装入透析袋中, 放入 0.02 mol/L、pH 7.4 的 PBS 中, 4 $^\circ\text{C}$ 下透析, 直至 NH_4^+ 去除后 (奈氏试剂检测), 再在 10 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液即得抗体的酶结合物, 加入等量甘油, 混匀, 分装, 于 -20°C 保存。

1.2.3 不同模式 ELISA 分析方法的建立

1.2.3.1 间接竞争 ELISA 法 (IC format) 采用方阵试验法测定包被抗原和抗体的稀释度, 选用 $\text{OD}_{490\text{ nm}}$ 值约为 1.0、抗原抗体用量较少的浓度组合为抗原-抗体的最适工作浓度。该工作浓度下, 将 H1-OVA、H2-OVA、H3-OVA、H4-OVA 用 CBS 稀释后包被于 96 孔聚苯乙烯酶标板 (100 μL 孔, 37 $^\circ\text{C}$ 下温育 2 h, PBST 洗涤 4 次), 封闭 (含 2.0% 脱脂奶的 PBS 300 μL 孔, 37 $^\circ\text{C}$ 温育 0.5 h, PBST 洗涤 4 次), 加入预先以 PBS 稀释的 H1-A b 和系列浓度的对硫磷标样 (由含 10% 甲醇的 PBS 配制, 设不加农药对照) 各 50 μL 孔, 振荡后温育 (37 $^\circ\text{C}$ 1 h, PBST 洗涤 4 次), 加入以 PBS 稀释 1 000 倍的酶标二抗, 100 μL 孔, 37 $^\circ\text{C}$ 下温育 1 h, PBST 洗涤 4 次; 加入 TMB 底物液, 100 μL 孔, 37 $^\circ\text{C}$ 下温育 15 min; 加入终止液, 100 μL 孔, 用酶标仪测定各孔的 $\text{OD}_{490\text{ nm}}$ 值。以抑制率为纵坐标,

对硫磷标样浓度对数为横坐标绘制半对数标准曲线。

按下式计算抑制率:

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

式中: OD_{max} ——不加药时的吸光值, OD_x ——农药浓度为 x 时的吸光值, OD_{min} ——空白对照的吸光值。

以抑制率达到 50% 的对硫磷浓度 (IC_{50}) 来表示 ELISA 方法的检测灵敏度, 以 IC_{10} 作为 ELISA 方法的最低检测限, 评价其在 $\text{IC}_{10} \sim \text{IC}_{90}$ 检测范围内的线性相关性。

1.2.3.2 直接竞争 ELISA 法, 包被抗体 (AC format) 采用方阵试验法测定包被抗体和酶标半抗原的稀释度, 选择 $\text{OD}_{490\text{ nm}}$ 值约为 1.0、抗体和酶标半抗原用量较少的浓度组合为抗体-抗原的最适工作浓度。工作浓度下, 将 H1-A b 以 PBS 稀释后包被于 96 孔聚苯乙烯酶标板, 封闭, 加入预先以 PBS 稀释的 H1-HRP、H2-HRP、H3-HRP、H4-HRP 和系列浓度的对硫磷标样各 50 μL 孔, 振荡后温育, 底物显色, 测各孔 $\text{OD}_{490\text{ nm}}$ 值。绘制半对数标准曲线, 计算 IC_{10} 、 IC_{50} 与 IC_{90} 值。

1.2.3.3 直接竞争 ELISA 法, 包被抗原 (CC format) 采用方阵试验法测定包被抗原和酶标抗体的稀释度, 选择 $\text{OD}_{490\text{ nm}}$ 值约为 1.0、抗原和酶标抗体用量较少的浓度组合为抗原-抗体的最适工作浓度。工作浓度下, 将 H1-OVA、H2-OVA、H3-OVA、H4-OVA 以 CBS 稀释后包被于 96 孔聚苯乙烯酶标板, 封闭, 加入预先以 PBS 稀释的 H1-A b-HRP 和系列浓度的对硫磷标样各 50 μL 孔, 振荡后温育, 底物显色, 测各孔 $\text{OD}_{490\text{ nm}}$ 值。绘制半对数标准曲线, 计算 IC_{10} 、 IC_{50} 与 IC_{90} 值。

1.2.4 添加回收率试验

水样 (杭州华家池水): 取水样经滤纸过滤后, 直接添加对硫磷标样, ELISA 测定。

土样 (黄红壤): 5 g 土壤, 添加标样, 用 10 mL 乙腈提取, 离心取上清液 1 mL, N_2 吹干, 用含 10% 甲醇的 PBS 液溶解, ELISA 测定。

稻米 (东北大米): 5 g 米样, 添加标样后加入 1.5 mL 水静置 30 min, 10 mL 乙腈提取。加入 1 g 氯化钠、4 g 硫酸镁, 振荡 1 min, 离心取上清液 1 mL, N_2 吹干, 用含 10% 甲醇的 PBS 液溶解, ELISA 测定。

2 结果与分析

2.1 半抗原结构鉴定

半抗原合成后的结构确证结果见表 1。从中

可以看出,合成的化合物均为设计结构。说明合成路线设计正确、操作科学,所合成半抗原能够用于后续实验。

表 1 合成半抗原的核磁共振氢谱数据

Table 1 ^1H NMR data of hap ten

半抗原 Hap ten	R ¹	R ²	n	^1H NMR, (CDCl ₃ , 400 Hz)
H1	4-NO ₂	H	4	1. 28 (t, 3H, CH ₃), 1. 52 ~ 1. 60 (m, 2H, NHCH ₂ CH ₂), 1. 61 ~ 1. 65 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ COOH), 2. 29 ~ 3. 01 (m, 2H, CH ₂ COOH), 3. 02 ~ 3. 07 (m, 2H, CH ₂ NH), 4. 01 ~ 4. 18 (m, 2H, CH ₂ OP), 7. 30 ~ 7. 33 (m, 2H, A _H), 8. 11 ~ 8. 15 (m, 2H, A _H)
H2	4-C(CH ₃) ₃	H	3	1. 30 (s, 9H, C(CH ₃) ₃), 1. 38 (t, 3H, CH ₃), 1. 81 ~ 1. 89 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 2. 46 (t, 2H, CH ₂ COOH), 3. 12 ~ 3. 17 (m, 2H, CH ₂ NH), 4. 12 ~ 4. 16 (m, 2H, CH ₂ OP), 7. 12 ~ 7. 14 (m, 2H, A _H), 7. 33 (d, 2H, A _H)
H3	2-NO ₂	5-F	3	1. 33 (t, 3H, CH ₃), 1. 86 ~ 1. 88 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 2. 42 ~ 2. 48 (m, 2H, CH ₂ COOH), 3. 16 ~ 3. 24 (m, 2H, CH ₂ NH), 4. 13 ~ 4. 20 (m, 2H, CH ₂ OP), 6. 98 ~ 7. 02 (m, 1H, A _H), 7. 38 ~ 7. 41 (m, 1H, A _H), 7. 97 ~ 8. 01 (m, 1H, A _H)
H4	2-F	4-NO ₂	3	1. 32 (t, 3H, CH ₃), 1. 87 ~ 1. 88 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 2. 46 (t, 2H, CH ₂ COOH), 3. 22 (t, 2H, CH ₂ NH), 4. 13 ~ 4. 20 (m, 2H, CH ₂ OP), 7. 00 ~ 7. 02 (m, 1H, A _H), 7. 49 ~ 7. 50 (m, 1H, A _H), 7. 90 (d, 1H, A _H)

2.2 ELISA方法最适工作浓度

最适工作浓度的筛选时,不同模式具有不同的抗原抗体用量,筛选结果见表 2。可见,同源分析(竞争半抗原 H1)在 3种模式下对抗原抗体的使用量均少于异源分析。以同源分析用量为比较基础,在 IC 模式下, H1-A_b的使用量异源分析为同源分析的 2~16倍;在 AC 模式下, H1-A_b的使用量异源分析为同源分析的 3~32倍;在 CC 模式下, H1-A_b-HRP的使用量异源分析为同源分析的 2~128倍。在 3种模式下均以竞争半抗原 H3情况下的抗原抗体用量最多。不论同源和异源分析,在同一竞争半抗原情况下, AC 模式所需 H1-A_b的量均高于 IC 模式; CC 模式所需包被抗原的量也均高于 IC 模式。

2.3 ELISA方法的检测灵敏度和检测限

在最适工作浓度下,采用不同模式的 ELISA 方法分别测定了 ELISA 方法的检测灵敏度(以 IC₅₀表示)和检测限(以 IC₁₀表示),结果(见表 3)表明,同一抗体条件下,异源分析可提高方法的检测灵敏度。在 IC 模式下,异源分析采用竞争半抗原 H3和 H4时其 IC₅₀分别为 3.26和 25.84 ng/mL,分别为同源分析检测灵敏度的 21.33和 2.69倍(竞争半抗原 H1时其 IC₅₀为 69.52 ng/mL);在

CC 模式下,异源分析比同源分析的检测灵敏度略有提高,但无倍数差异;在 AC 模式下,同源分析在 1000 ng/mL 内未能建立标准曲线,而异源分析采用竞争半抗原 H3时其 IC₅₀为 16.94 ng/mL,高于另外 3个竞争半抗原情况下的检测灵敏度。

不论同源和异源分析,在使用同一竞争半抗原情况下, IC 模式的检测限都低于 AC 模式;在 H1、H3、H4半抗原情况下 IC 模式的检测限也都低于 CC 模式,而在 H2半抗原情况下 CC 模式的检测限比 IC 模式略低(无倍数差异)。对方法检测灵敏度和检测限 3次测定的变异系数结果显示: CC 模式下方法重现性较差,其 IC₅₀与 IC₁₀变异系数在 18.46%~27.63%之间; IC 模式和 AC 模式的方法重现性较好,其 IC₅₀与 IC₁₀变异系数分别在 2.86%~5.32%和 3.14%~7.80%之间。

2.4 样品添加回收率试验

鉴于 2.3节的实验结果,选取方法重现性好、检测灵敏度相对较高的 ELISA 模式和竞争半抗原进行水样、土样和稻米中对硫磷的添加回收率试验。在竞争半抗原为 H3情况下,采用 IC 模式和 AC 模式建立的免疫反应抑制率与农药浓度半对数的标准曲线(图 1),其线性相关性较好(R² > 0.98), IC 模式 ELISA 反应标准曲线的 IC₁₀平均

表 2 ELISA 分析法最适工作浓度

Table 2 Working concentration of immunoassays

分析方法 Immunoassays	半抗原 Haptens	ELISA 模式 ELISA format	人工抗原或 酶标半抗原 Antigen/Hapten- HRP	抗体或酶标抗体 Antibody/Antibody- HRP	工作浓度 Working concentration/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
					Working concentration/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
					人工抗原或酶标半抗原 Antigen/Hapten- HRP	抗体或酶标抗体 Antibody/Antibody- HRP
同源分析 Homologous assay	H1	IC	H1-OVA	H1-Ab	0.25	0.50
		AC	H1-HRP	H1-Ab	0.50	2.00
		CC	H1-OVA	H1-Ab-HRP	4.00	0.50
异源分析 Heterologous assay	H2	IC	H2-OVA	H1-Ab	2.00	1.00
		AC	H2-HRP	H1-Ab	8.00	16.00
		CC	H2-OVA	H1-Ab-HRP	16.00	4.00
	H3	IC	H3-OVA	H1-Ab	8.00	8.00
		AC	H3-HRP	H1-Ab	64.00	64.00
		CC	H3-OVA	H1-Ab-HRP	96.00	64.00
	H4	IC	H4-OVA	H1-Ab	0.50	1.00
		AC	H4-HRP	H1-Ab	0.25	6.00
		CC	H4-OVA	H1-Ab-HRP	8.00	1.00

表 3 ELISA 方法检测灵敏度和检测限 ($n = 3$)

Table 3 Sensitive (IC_{50}) and limit of detection (IC_{10}) of parathion with different ELISA format ($n = 3$)

分析方法 Immunoassays	半抗原 Hapten	模式 Format	IC_{50} /(ng/mL)	变异系数 CV (%)	IC_{10} /(ng/mL)	变异系数 CV (%)	线性范围 Linear range/(ng/mL)
同源分析 Homologous assay	H1	IC	69.52	3.71	1.66	5.14	1.66 ~ 2915
		AC	- ^a	-	-	-	-
		CC	80.38	18.46	6.99	21.67	6.99 ~ 924
异源分析 Heterologous assay	H2	IC	72.32	4.90	4.16	5.32	4.16 ~ 1256
		AC	134.9	5.43	5.00	7.80	5.00 ~ 3638
		CC	59.72	21.90	3.29	27.31	3.29 ~ 1084
	H3	IC	3.26	2.86	0.05	4.57	0.05 ~ 219
		AC	16.94	3.14	0.45	4.92	0.45 ~ 633
		CC	-	-	-	-	-
	H4	IC	25.84	3.65	1.11	5.20	1.11 ~ 602
		AC	373.8	4.11	12.28	4.97	12.38 ~ 1.14 $\times 10^4$
		CC	65.70	20.51	6.39	27.63	6.39 ~ 675

^a - 表示 1 000 ng/mL 以内无法建立标准曲线。^a - denotes can not establish a standard curve below 1 000 ng/mL.

值为 0.11 ng/mL (10 条标准曲线, 下同), IC_{50} 平均值为 3.67 ng/mL; AC 模式 ELISA 反应标准曲线的 IC_{10} 平均值为 1.46 ng/mL, IC_{50} 平均值为 22.41 ng/mL。

依据标准曲线计算添加回收率结果见表 4 (4 次平行测定)。样品添加回收率测定值变异系数在 IC 模式下为 7.81% ~ 13.28%, 在 AC 模式下为 4.70% ~ 13.91%, 其精密度均达到了农药残留试验检测的要求。样品添加回收率测定值在 AC 模式下的平均回收率均较低, 平均回收率最高也仅为 60.77%。而在 IC 模式下水样和土样的平均添

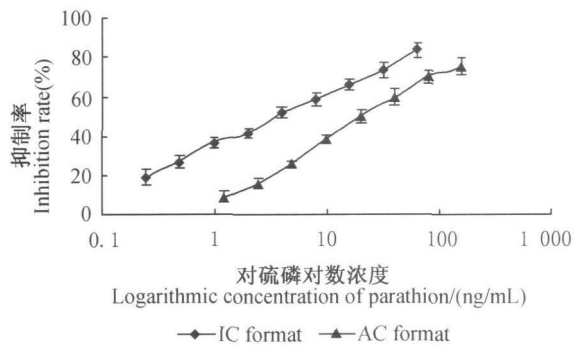


图 1 对硫磷 ELISA 竞争反应标准曲线
Fig 1 ELISA standard competitive reaction curve for parathion

加回收率为 71.40% ~ 106.46%, 稻米的平均添加回收率为 65.73% 和 79.67%。

除稻米样品 50 ng/mL 添加外, IC 模式下 3 种样品中对硫磷的添加回收率均满足残留检测的要

求 (70% ~ 110%)。比较 IC 模式和 AC 模式中对硫磷的添加回收率试验结果, 可知 IC 模式抗基质干扰能力比 AC 模式强, 基质对 ELISA 方法的干扰影响为水 < 土 < 稻米。

表 4 添加回收率试验结果 (n = 4)

Table 4 Recoveries of parathion for spiked samples (n = 4)

样品 Sample	添加水平 Fortification level/(ng/mL)	IC 模式 IC format		AC 模式 AC format	
		平均回收率	变异系数	平均回收率	变异系数
		Average recovery (%)	CV (%)	Average recovery (%)	CV (%)
水 Water	10	106.46	10.02	35.48	8.26
	20	89.73	9.30	53.51	11.51
土 Soil	20	71.40	7.81	47.62	9.25
	50	83.06	11.16	60.77	4.70
稻米 Rice	50	65.73	13.28	39.48	13.91
	100	79.67	9.68	55.21	6.86

3 讨论

随着免疫分析化学的进一步发展, 异源分析在灵敏度方面的优越性及合适竞争原选择方面的研究日渐受到人们的关注^[13]。作者以对硫磷为例, 设计并合成了 4 种与对硫磷结构相似的竞争半抗原, 成功建立了对硫磷的同源分析和异源分析 ELISA 方法, 其方法检测灵敏度高于 Zeng^[14]等人对对硫磷 ELISA 方法的最新报道 (IC₅₀ 为 360 ng/mL, IC₁₀ 为 26 ng/mL)。异源分析与同源分析比较的结果表明, 尽管异源分析对抗原抗体的所需量比同源分析有所增加, 但异源分析可大大提高方法的检测灵敏度。

不论同源或异源分析, ELISA 方法都需要采用一种合适的模式以提高方法的灵敏度。据 Kolosova^[8]等人对甲基对硫磷同源 ELISA 方法的 AC 模式、IC 模式和荧光免疫测定方法的抗体特异性和样品添加回收率试验的比较结果, 在同源分析中以 IC 模式的灵敏度最高。为探讨方法模式对异源 ELISA 法各分析参数的影响情况及机理, 本研究以对硫磷为例, 对异源分析中不同模式下的抗原抗体用量、方法检测灵敏度、检测限及不同样品添加回收率进行了比较研究。结果表明, IC 模式所需步骤较多 (需要加酶标二抗), 但其对抗原抗体的用量相对较少, 在 3 种竞争半抗原情况下 IC 模式所表现出的方法检测灵敏度均高于其他模式, 且 IC 模式下样品添加回收率较好, 表明 IC 模式抗样品基质干扰能力强。究其原因, 可能

是因为 IC 模式采用酶标二抗间接标记的方法, 放大了酶促显色现象, 使农药的竞争作用更容易在其 OD 值中得到反映, 从而提高了方法的检测灵敏度。而 AC 模式和 CC 模式分别采用酶直接标记半抗原和抗体的方法, 所需步骤均比 IC 模式少, 但 CC 模式的方法重现性较差; AC 模式对特异性抗体的用量最多, 检测灵敏度也不及 IC 模式, 用于样品添加回收率试验无法满足残留检测的要求。Abad^[15]等人建立克百威 ELISA 方法时所设计的 6 种竞争半抗原都能建立 IC 模式, 而只有一种竞争半抗原能建立 AC 模式。采用直接法虽然步骤较少, 但不同结构的竞争半抗原不一定都建立 AC 或 CC 模式, 却基本上都能建立 IC 模式。

综上所述, 在异源 ELISA 分析中, 虽然 IC 模式所需的步骤比 AC 模式和 CC 模式多, 但 IC 模式易于建立, 其灵敏度较高, 抗外界环境和基质干扰的能力强, 为异源 ELISA 法中较优的模式。

参考文献:

- [1] ZHANG Q, SUN Q, HU B S, et al Development of a Sensitive ELISA for the Analysis of the Organophosphorous Insecticide Fenthion in Fruit Samples [J]. Food Chemistry, 2008, 106: 1278-1284.
- [2] L U Ting-feng (刘廷凤), YANG M in-na (杨敏娜), L U Ya-zi (刘亚子), et al 菊酯类农药酶联免疫吸附测定研究进展 [J]. Environmental Science and Technology (环境科学与技术), 2006, 29(4): 100-102.
- [3] GOODROW M H, HARRISON R O, HAMMOCK B D. Hap ten Synthesis, Antibody Development, and Competitive Inhibition Enzyme Immunoassay for S-Triazine Herbicide [J]. J Agric

- Food Chem, 1990, 38: 990-996.
- [4] GALVE R, BAEZA F S, CAMPS F. Indirect Competitive Immunoassay for Trichlorophenol Determination: Rational Evaluation of the Competitor Heterology Effect [J]. Anal Chim Acta, 2002, 452: 191-206.
- [5] KM Y J, CHO Y A, HAMMOCK B D, et al. Synthesis of Haptens for Immunoassay of Organophosphorus Pesticides and Effect of Heterology in Hapten Spacer Arm Length on Immunoassay Sensitivity [J]. Anal Chim Acta, 2003, 475: 85-96.
- [6] SHI Hai-yan (施海燕), ZHU Guo-nian (朱国念), ZHEN Zun-tao (郑尊涛), et al. 同源与异源分析对 ELISA 检测灵敏度和特异性的影响 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2005, 7(4): 349-352.
- [7] SCHNEDER P, HAMMOCK B D. Influence of the ELISA Format and the Hapten-Enzyme Conjugate on the Sensitivity of an Immunoassay for S-Triazine Herbicides Using Monoclonal Antibodies [J]. J Agric Food Chem, 1992, 40: 525-530.
- [8] KOLOSOVA A Y, PARK J H, EREMINSKA A, et al. Comparative Study of Three Immunoassays Based on Monoclonal Antibodies for Detection of the Pesticide Parathion-methyl in Real Samples [J]. Anal Chim Acta, 2004, 511: 323-331.
- [9] KM Y J, KM Y A, LEE Y T, et al. Enzyme-linked Immunosorbent Assays for the Insecticide Fenitrothion: Influence of Hapten Conformation and Sample Matrix on Assay Performance [J]. Anal Chim Acta, 2007, 591: 183-190.
- [10] LIU Y H, JIN M J, GUI W J, et al. Hapten Design and Indirect Competitive Immunoassay for Parathion Determination: Correlation with Molecular Modeling and Principal Component Analysis [J]. Anal Chim Acta, 2007, 591: 173-182.
- [11] KM M J, LEE H S, CHUNG D H, et al. Synthesis of Haptens of Organophosphorus Pesticides and Development of Enzyme-linked Immunosorbent Assays for Parathion-methyl [J]. Anal Chim Acta, 2003, 493: 47-62.
- [12] YANG Li-guo (杨利国), HU Sao-chang (胡少昶), WEI Ping-hua (魏平华), et al. 酶免疫测定技术 [M]. Nanjing (南京): Nanjing University Press (南京大学出版社), 1998: 242-263.
- [13] LIU Yi-hua (刘毅华), ZHU Guo-nian (朱国念), GUI Wen-jun (桂文君). 分子模拟在农药半抗原设计及其免疫识别机制中的应用 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2007, 9(3): 201-208.
- [14] ZENG K, YANG T B, ZHONG P, et al. Development of an Indirect Competitive Immunoassay for Parathion in Vegetables [J]. Food Chemistry, 2007, 102: 1076-1082.
- [15] ABAD A, MORENO M J, MONTOLYA A. Development of Monoclonal Antibody-Based Immunoassays to the N-Methylcarbamate Pesticide Carbofuran [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 2475-2485.

(Ed. JIN S H)

2009年《精细化工中间体》征订启事

《精细化工中间体》(ISSN 1009-9212, CN 43-1354/TQ)属中国化工学会精细化工专业委员会中间体协作网专业期刊,是美国《化学文摘》(CA)全球重点收录期刊,是其摘用频度最大的1000种期刊之一。主办单位为湖南化工研究院。刊物着重报道国内外精细化工领域重点、热点产品或方向的研究开发进展情况;农药、医药及其中间体的研究开发、技术创新及分析测试;染料及其中间体的研究开发、应用研究及分析测试;其他多用途有机中间体的新产品、新工艺、新技术、新设备的研究开发成果;最新有机、无机功能材料的研究开发成果;精细有机化工行业设计、生产等领域的新工艺、新技术、新设备、新材料;精细有机化工生产企业的生产操作经验、技术改造、化工环保、资源再生、循环经济及生产节能;精细有机化工中间体新建项目可行性探讨、工艺技术路线选择与评价、新建项目的投资效益分析。主要栏目有:综述与专论、农药及中间体、医药及中间体、功能材料、有机合成原料、香精香料、表面活性剂、染料颜料涂料、水处理剂、分析测试等等。刊物读者定位为化工企业、科研院所和高等院校、政府部门等化工管理和科研设计人员;希望深入了解国内外化工新技术、新产品开发研究情况的化工从业人员及化工设备、仪器仪表、化学试剂等生产厂家。

双月刊,逢双月底出版,72元/年。邮发代号:42-132,各地邮局均可订阅,也可直接汇款到杂志社,随到随订。广告经营许可证号:4300004000134,欢迎发布广告。

地址:湖南长沙芙蓉中路二段251号(410007)

电话:0731-5357909, 5357908(传真)

主页:www.j-fci.com

电邮:j-fci@163.com

收款单位:湖南化工研究院

开户行:工商银行东塘支行

帐号:1901009009022100341