

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01737

吡虫啉的酶联免疫吸附分析方法研究

彭方毅¹ 姜海蓉*¹ 陈远翔¹ 陈胜珍¹ 林治华¹
廖璞*² 何苗³ 施汉昌³ 蔡强⁴

¹(重庆理工大学药学与生物工程学院,重庆 400050) ²(重庆市临床检验中心,重庆 400014)

³(清华大学环境模拟与污染控制国家重点联合实验室,北京 100084)

⁴(浙江清华长三角研究院生态环境研究所,嘉兴 314001)

摘要 通过碳二亚胺法将吡虫啉交联于牛血清蛋白(BSA)作为免疫抗原,混合酸酐法将吡虫啉交联于卵清蛋白(OVA)作为包被抗原,免疫 Balb/c 小鼠,采用 B 细胞杂交瘤技术,经免疫、融合、筛选、克隆,得到抗吡虫啉单克隆抗体,抗体亚类为 IgG1,制备的单克隆抗体效价达 1×10^7 ,确定了吡虫啉酶联免疫吸附分析方法(ELISA)的最佳工作条件,建立了定量测定吡虫啉的间接竞争 ELISA 方法。本方法的 IC_{50} 为 $(15.12 \pm 1.28) \mu\text{g/L}$,检出限为 $(1.76 \pm 0.02) \mu\text{g/L}$ 。与其它吡虫啉结构类似物无交叉反应。批内相对标准偏差为 4.5%;批间相对标准偏差 5.1%,饮用水、重庆理工大学地下水和重庆市花溪河地表水平均添加回收率分别为 102%,97% 和 85%。本研究建立了一种快速检测环境中吡虫啉残留的方法。

关键词 吡虫啉; 半抗原; 酶联免疫分析法; 单克隆抗体

1 引言

吡虫啉(IMI)属中等毒性,通过阻断神经受体并且导致害虫麻痹最终死亡。在哺乳动物体内有蓄积作用^[1],对人体外周血淋巴细胞遗传物质易造成损害^[2]。由于吡虫啉已广泛应用于农业生产,进入水环境的途径日益增多,环境样品中发现吡虫啉残留的情况也日趋严重。因此,建立一种测定这类化合物的简单、快速、有效的方法非常必要。目前,这类化合物的检测方法多以高效液相色谱法(HPLC)为主^[3-4],但需精密仪器,费时长,不适合大批量样品的快速测定。免疫分析方法尤其是酶免疫分析方法,因其成本低、速度快、灵敏度高、仪器设备简单,适合大批量样品的快速分析,可为吡虫啉残留的检测和监控提供了极大的便利条件^[5-6]。吡虫啉的免疫分析技术多采用多克隆抗体,未见吡虫啉单克隆抗体的相关报道^[7-10]。本研究采用本实验室制备的吡虫啉特异性单克隆抗体,建立了定量测定吡虫啉的间接竞争 ELISA 方法,快速准确地分析检测吡虫啉在样本中的残留量。本方法灵敏度高特异性强,样品前处理简单,便于进行现场监控,可以与常规方法互为补充。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

550 型酶联免疫检测仪(美国 Bio-Rad 公司);96 孔酶标板(美国 Corning 公司);紫外可见分光光度计(日本岛津公司)。Protein A 亲和层析柱(Amersham Biosciences 公司)。台式高速冷冻离心机(美国 Beckmancoulter 公司)。

6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠(每只约 18~20 g,重庆医科大学实验动物中心);吡虫啉完全抗原(本研究室制备);小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞(本研究室保存);95% 吡虫啉原药(重庆农药化工(集团)有限公司);吡虫啉标准品(99.2%,Sigma 公司);羊抗兔 IgG-HRP(Sigma 公司);四甲基联苯胺(TMB,北京鼎国生物技术有限公司);酶联免疫吸附测定(ELISA)中所用的试剂均为国产分析纯试剂,按照文献[11]自配。牛血清白蛋白(BSA,华美生物工程公司进口分装),卵清蛋白(OVA);IMEM 培养基

2010-02-10 收稿;2010-06-10 接受

本文系国家 863 项目(No. 2007AA062419);重庆市科委自然科学基金(Nos. 2008BB5331,2009BB7231);重庆市教委自然科学基金(No. 91090614,KT100828)和清华大学环境模拟与污染控制国家重点联合实验室专项经费(No. 09K05ESPCT)资助项目。//www.cnki.net

* E-mail: r0102@163.com; liaopu@sina.com

(Gibco) 羊抗小鼠 IgG HRP 酶标二抗(华美生物工程公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 吡虫啉免疫原与包被原的制备与鉴定 采用碳二亚胺法^[12]将半抗原吡虫啉与 BSA 偶联制备免疫抗原;采用混合酸酐法^[13]将吡虫啉与 OVA 偶联制备包被抗原。反应液在 0.01 mol/L PBS(pH 7.2) 中 4 °C 透析,去除游离小分子化合物,偶联物分装后于 -20 °C 保存。根据半抗原、载体蛋白质和偶联物的紫外扫描图谱鉴定半抗原是否与载体蛋白质有效偶联。根据三者选定波长(280 nm)的摩尔吸光系数(ϵ)估算半抗原与载体蛋白质的结合比: $R = (\epsilon_{\text{偶联物}} - \epsilon_{\text{载体蛋白}}) / \epsilon_{\text{半抗原}}$ 。

2.2.2 抗体制备 用免疫原皮下多点免疫 Balb/c 小鼠,每只 100 μg 。每隔 3 周进行 1 次加强免疫。每次免疫 1 周后取小鼠尾静脉血用 ELISA 方法检测抗体效价,当抗体效价达到 $10^4 \sim 10^5$ 时开始融合。融合前 3 天尾静脉加强免疫。第 3 天进行细胞融合。免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞(Sp2/0)以 10:1 混合,用 50% 聚乙二醇(PEG)作融合剂将这 2 种细胞融合,融合细胞悬于含 20% 小牛血清的 2% HAT 选择性培养基内,分种于加有昆明小鼠腹腔渗出细胞作滋养层的 96 孔细胞培养板中,37 °C 下置于 5% CO_2 培养箱中培养,生长达 1/3 ~ 1/4 视野时,取上清液筛选。融合后第 6 ~ 8 d,融合细胞开始形成集落,计算细胞融合率,并进行全换液,3 ~ 5 d 后进行第一次 ELISA 筛选。以筛选到仅与吡虫啉-OVA 阳性反应,与 BSA、OVA 不反应的孔进行亚克隆。一般亚克隆后第 7 ~ 10 d 再进行单克隆孔的 ELISA 筛选,如此亚克隆 3 ~ 5 次。然后扩大培养,建株,冻存并制备腹水。

2.2.3 腹水的制备及抗体类及亚类测定 选取 20 ~ 22 g 雌性 Balb/c 小鼠,每只腹腔注射 0.5 mL 降殖烷。7 d 后,腹腔注射杂交瘤细胞 2×10^6 细胞/只。7 ~ 14 d 后待小鼠腹部显著膨隆,处死小鼠并取出腹水,以 10^4 r/min 离心 30 s,吸出上清液备用。抗体的免疫球蛋白类别及亚类鉴定采用抗体亚类鉴定试剂盒。

2.2.4 腹水中抗体的纯化 根据单抗的亚类而选用不同的纯化方法,由于所获得的抗体都是 IgG_1 ,故选用高盐 ProteinA-Sepharose-4B 柱纯化抗抗体^[11]。

2.2.5 抗体效价鉴定 抗体 IgG 含量用 ELISA 方法测定,抗体效价测定以 OVA-吡虫啉为包被抗原,抗体从 1/1000 倍起倍比稀释,以 Sp2/0 细胞培养上清液为阴性对照,用间接 ELISA 方法测定抗体效价,以 $(A_{\text{exp}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{ref}} - A_{\text{blank}}) \geq 2.1$ 的最大稀释倍数为抗体效价。

2.2.6 抗原抗体最佳浓度的确定及间接竞争抑制方法建立 用方阵实验确定包被抗原和抗体的最适浓度,抗原抗体用量少的实验组合作为最佳工作条件^[14-16]。包被抗原(吡虫啉-OVA)在包被缓冲液中被稀释成 0.5 ng/L,在酶标板每孔中加入 100 μL ,密封后 4 °C 过夜,弃去包被抗原,洗涤液洗涤 3 次,加入 200 μL 封闭液(1% 牛奶)37 °C 温育 2 h。每孔加入用 50 μL 标准浓度梯度的吡虫啉(从 3.0 mg/L 依次以 0.3 倍稀释)和 50 μL 抗体(每组设 3 个平行实验)进行梯度实验。根据四参数的 Logistic 模型确定 IC_{50} 、定量检测范围,采用 $X_0 \pm 3\text{SD}$ 法确定检出限。

3 结果与讨论

3.1 吡虫啉完全抗原鉴定结果

BSA 上共价结合了半抗原后,明显具备了半抗原的紫外吸收光谱特征,并在 280 nm 处的摩尔吸光系数明显增加,表明半抗原与载体蛋白质有效偶联。根据半抗原、载体蛋白和人工抗原在 280 nm 处的摩尔吸光系数 ϵ ,按 2.2.1 节的公式计算,半抗原与 BSA 的结合比为 22:1,与 OVA 的结合比为 10:1。

吡虫啉属于小分子化合物(分子量 255.7),为半抗原类物质,过多的半抗原并不能得到预期的结果,这是因为载体上覆盖的半抗原分子过多时,可能不利于载体与淋巴细胞表面结合。免疫原的偶联比对抗体特异性有影响,一般认为偶联比在 5:1 ~ 30:1 范围内能产生较高特异性的抗体^[12,13]。本研究合成的完全抗原的偶联比为 22:1,符合产生特异性抗体的要求。

3.2 抗体类和亚类的鉴定

经过融合、筛选、4 次亚克隆及建株,及 BSA、OVA、吡虫啉-BSA、吡虫啉-OVA 包被物进一步筛选培养后,得到 6 株稳定分泌抗体的杂交瘤 10B5,8C10,2E1,15F2,10G5 和 3H2。ELISA 检测已建株杂交瘤的类和亚类及效价。将其上清液与已包被好的(PBS 1/1000 稀释)类及亚类特异性抗体(IgM , IgA ,

IgG₃, IgG₁, IgG_{2a} 和 IgG_{2b}) 之间的反应, 6 株单抗均与 IgG₁ 抗体有最强的反应, 与其它 5 种抗体无或较弱反应。表 1 中的读数均为用抗体亚类试剂盒在 492 nm 测定时的吸光度值。免疫球蛋白的轻链分为 κ 型和 λ 型。

表 1 吸光度法鉴定 5 株单抗的类和亚类

Table 1 Identification of species and subset of antibody(Ab)

单抗 Monoclonal antibody	IgM	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃	IgA	κ	λ
10B5	0.058	0.572	0.066	0.067	0.094	0.044	0.357	0.043
8C10	0.077	0.662	0.089	0.091	0.056	0.063	0.395	0.049
2E1	0.067	0.614	0.045	0.065	0.080	0.052	0.415	0.073
15F2	0.094	0.504	0.087	0.088	0.056	0.088	0.451	0.050
10G5	0.032	0.607	0.056	0.045	0.050	0.049	0.387	0.045
3H2	0.037	0.669	0.094	0.065	0.089	0.043	0.600	0.062

由表 1 得知 6 株单抗均为 IgG₁ 亚型 轻链为 κ 链。经测定 8C10 的腹水效价为 1×10^7 , 其余 4 株单抗的腹水效价均为 1×10^6 , 故选择 8C10 建立间接竞争 ELISA 方法和检测实际水样。

3.3 间接竞争 ELISA 方法的最佳工作条件及标准曲线的建立

经方阵实验优化筛选, 水体中吡虫啉间接竞争 ELISA 测定最佳工作条件为: 包被抗原为 0.5 mg/L 包被酶标板 4 °C 过夜; 单克隆抗体用 6000 倍 PBS 缓冲液稀释, 进行竞争反应前, 抗体与待测样品预反应 0.5 h; 待测样品及包被抗原与抗体竞争性反应时间为 1 h, 反应温度为 37 °C, 加酶标二抗反应时间为 1 h。按上述标准实验条件建立吡虫啉的间接竞争 ELISA 方法, 图 1 曲线采用四参数的 Logistic 模型拟合, 采用 Origin 8.0 软件, 结果如下: 标准曲线的 IC₅₀ 值为 $(15.12 \pm 1.28) \mu\text{g/L}$, 计算得到间接竞争 ELISA 方法的检出限为 $(1.76 \pm 0.02) \mu\text{g/L}$ 。

3.4 检测方法的特异性和准确度

用于抗体交叉反应性研究的竞争物为啶虫脒、噻虫啉、噻虫胺和赛虫嗪, 以单抗对吡虫啉的 50% 抑制浓度 (IC₅₀) 与对竞争物的 IC₅₀ 之比的百分数为其交叉反应率 (CR, %)。以交叉反应率高低比较抗体的特异性。包被抗体间接竞争 ELISA 法测定吡虫啉结构类似物 (啶虫脒、噻虫啉、噻虫胺和赛虫嗪) 与抗体的交叉反应率分别为 0.052%, < 0.001%, < 0.001%, < 0.001%。由此可见, 所得到的单克隆抗体对吡虫啉有较好的特异性。

板内和板间各重复测定 6 次。在样品浓度为 5, 10 和 50 μg/L 时, 批内和批间相对标准偏差分别为 4.5% 和 5.1%, 均小于 10%, 表明本方法的精密度较好。

3.5 样品分析

应用建立的间接竞争 ELISA 方法测定了加入吡虫啉标准品的饮用水、重庆理工大学自来水 (即地下水) 和重庆市花溪河的地表水, 并采用添加乙醇、BSA 的反应缓冲溶液来削弱样品基质对检测结果的干扰。不同来源水样中分别添加 50, 10 和 5 μg/L 的吡虫啉, 每个浓度重复测定 6 次, 以同一块酶标板上建立的标准曲线进行定量分析, 当原水样 (添加浓度为 0 μg/L) 计算浓度均小于 0.10 μg/L, 超出本方法的检出限, 视为未检出, 因此均按照 $x_0 = 0 \mu\text{g/L}$ (初始浓度为 0 μg/L) 计算回收率, 结果见表 2。从表 2 可见, 在饮用水、重庆理工大学地下水和重庆市花溪河地表水中添加不同浓度吡虫啉后, 间接竞争 ELISA 方法的平均添加回收率分别为 102%、97% 和 85%, 符合国家环保总局的标准 (痕量有机污染物定量检测结果回收率应在 70% ~ 130%)。饮用水回收率的偏差比地下水和地表水小, 这是由于地下水和地表水钙离子含量高, 硬度大, 其次地表水的 COD 值高, 可能含有腐植酸等干扰抗原抗体特异性反应

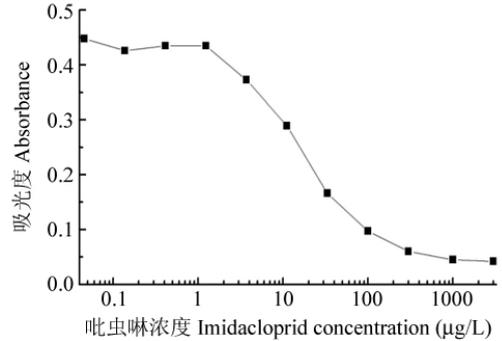


图 1 吡虫啉的间接竞争 ELISA 标准曲线
Fig. 1 Indirect competitive ELISA curve for imidacloprid

的物质^[17]，这两个因素都可能影响抗原抗体的反应。

表 2 不同水样中添加吡虫啉的回收率

Table 2 Recovery of imidacloprid in different water samples

水样 Water sample	添加浓度 Added ($\mu\text{g/L}$)	测定值 Found ($\mu\text{g/L}$)	回收率 Recovery (% $n=6$)	水样 Water sample	添加浓度 Added ($\mu\text{g/L}$)	测定值 Found ($\mu\text{g/L}$)	回收率 Recovery (% $n=6$)
地下水 Underwater	50	56	112	饮用水 Drinking water	50	48	96
	10	10.5	105		10	9.5	95
	5	4.5	90		5	5	100
地表水 Surface water	50	49	98				
	10	7.7	77				
	5	4.0	80				

结果表明，本研究制得了特异性较好的吡虫啉单克隆抗体，并建立了水中吡虫啉测定的间接竞争 ELISA 方法，精密度和准确度均符合残留测定的要求。单克隆抗体的特异性比多克隆抗体好，但是成本也高于多抗。本方法可用于地下水、地表水、饮用水等不同水样吡虫啉的检测。与 HPLC 方法比较，本方法的主要优点在于不需要复杂的样品前处理，水样可直接用于检测，不需要昂贵的仪器设备。

References

- ZHANG Zhen-Ling(张珍玲), TANG Ling-Fang(唐玲芳), JIANG Yun-Shen(姜允申), SONG Ling(宋玲), XIAO Hang(肖杭), CHENG Jian(程健), YANG Yong-Nian(杨永年). *Acta Academiae Medicinae Nanjing*(南京医科大学学报(自然科学版)), **1996**, 16(3): 274~276
- Vilchez J L, Khattabi R E, Fernfindez J, Casado A G, Navalon A. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 746(2): 289~294
- DAI Hua(戴华), LI Yong-Jun(李拥军), ZHANG Ying(张莹). *Journal of Instrumental Analysis*(分析测试学报), **2002**, 21(1): 70~72
- WU Li-Qin(吴俐勤), WU Sheng-Gan(吴声敢), LIU Yu(刘宇). *Modern Scientific Instruments*(现代科学仪器), **2003**, (1): 52~54
- Lee J K, Ahn K C, Park O S, Kang S Y, Hammock B D. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49(21): 59~63
- Shigeyuki W, Shigekazu I, Yoshio K, Naiki O, Tetsuo Y, Hiroshi M, Takashi K, Yojiro Y. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 427(2): 211~214
- Kai L, Qing X L. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48(3): 378~384
- Farre M, Kantiani L, Barcelo D. *Trends in Analytical Chemistry*, **2007**, 26(11): 1100~1112
- Cheng N Y, Ping M, Zhong J G, Yi Liu. *Chin. J. Chem.* **2007**, 25(8): 1085~1090
- Mak S K, Shan GM, Lee H J, Watanabe T, Stoutamire D W, Hammock B D. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 534(1): 109~120
- YANG L i-Guo(杨利国), HU Shao-Chang(胡少昶), WEI Ping-Hua(魏平华), GUO Ai-Zhen(郭爱珍). *Techniques of Enzyme Immunoassay*(酶免疫测定技术). Beijing(北京): Nanjing University Press(南京大学出版社), **1998**: 439~442
- YOU Hai-Qin(尤海琴), LIU Lang(刘浪), LIU Shu-Zhao(刘曙照). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2009**, 37(4): 577~580
- LI Bo(李波), SHI Hai-Yan(施海燕), WANG Ming-Hua(王鸣华). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2008**, 36(1): 34~38
- Sheng J W, He M, Shi H C. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 603(1): 111~118
- Wang N, He M, Shi H C. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 590(2): 224~231
- PENG Fang-Yi(彭方毅), HE Miao(何苗), SHENG Jian-Wu(盛建武), SHI Hang-Chang(施汉昌). *Acta Chimica Sinica*(化学学报), **2007**, 65(22): 2563~2569
- National Environmental Protection Bureau(中国国家环境保护总局). *Monitoring Method of Water and Waste Water*, 4th ed.(水和废水监测分析方法, 第四版). Beijing(北京): Chinese Environmental Science Press(中国环境科学出版社), **2002**: 81

An Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Detection of Imidacloprid

PENG Fang-Yi¹, JIANG Hai-Rong^{*1}, CHEN Yuan-Xiang¹, CHEN Sheng-Zhen¹,

LIN Zhi-Hua¹, LIAO Pu^{*2}, HE Miao³, SHI Han-Chang³, CAI Qiang⁴

¹(School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400050)

²(Clinical Laboratory Center of Chongqing, Chongqing 400014)

³(State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Tsinghua University, Beijing 100084)

⁴(Department of Environmental Technology and Ecology, Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Jiaxing 314000)

Abstract To measure imidacloprid (IMI) in water, the hapten (imidacloprid) was conjugated to bovine serum albumin (BSA) with the carbodiimide method to form immunogen IMI-BSA; the hapten imidacloprid was conjugated to ovalbumin (OVA) with mixed carbonic anhydride method to form the coating antigens. Balb/c mice were immunized intraperitoneally with as prepare immunogen. Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies (McAbs) against imidacloprid, which was obtained through routine hybridoma technology and ELISA screening. The subtype of secreting McAbs was IgG1. The titer of antibody was 1×10^7 . After optimization of the ELISA conditions, an indirect ELISA procedure for the determination of imidacloprid was established. The limit of detection was $(1.76 \pm 0.02) \mu\text{g/L}$ and IC_{50} was $(15.12 \pm 1.28) \mu\text{g/L}$. The McAbs had no cross-reaction with some analogues of imidacloprid. Intra-assay RSD reached 4.5%, and inter-assay RSD reached 5.1%. The recoveries obtained by standard imidacloprid addition to the different samples as drinking water, underwater and surface water were 102%, 97% and 85%, respectively. The produced monoclonal antibodies and the developed ELISA procedure may become a convenient and satisfied analytical tool for monitoring imidacloprid residues in environmental samples.

Keywords Imidacloprid; Hapten; Enzyme linked immunosorbent assay; Monoclonal antibody

(Received 10 February 2010; accepted 10 June 2010)

《近红外光谱法快速分析药品》

该书是介绍利用近红外光谱方法进行假药识别,实现药品无损定性、定量分析,并同时分析活性成分和辅料,提供产品的指纹信息等方面的专著。不仅详细介绍了建立药品通用性近红外模型的基本理论,NIR通用性模型的建模思路与方法,而且对建立液体制剂、粉针剂、口服固体制剂通用性近红外定性、定量模型的一般方法分别进行了论述,还对目前流行的在流通领域快速筛查假劣药品的近红外无模型检测技术进行了介绍。

该书可作为以近红外分析技术从事打击假劣药品工作的药品检验人员的培训教材,对从事药物分析、光谱分析、化学计量学等方面的科研工作者有参考和实用价值;亦可作为大专院校研究生和高年级学生学习光谱分析、药物分析课的参考书。

该书由胡昌勤、冯艳春著,化学工业出版社于2010年1月出版,定价85.00元。