

三氮苯类除草剂的酶联免疫吸附测定* (ELISA)方法研究

单国民 钱传范

(中国农业大学农业应用化学系,北京 100094)

过琴媛 程明 苏巧玲

(卫生部北京生物制品研究所)

摘要: 根据三氮苯类除草剂的结构特征,合成了三种不同的抗原,制备了三种高效价抗体,建立了检测莠去津、西玛津、扑草净残留量的酶联免疫吸附测定(ELISA)方法,方法的检测极限分别为 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。三种抗体对待检农药均有很高的特异性, H_1BSA 抗体对莠去津、西玛津、扑草净、西草净和环嗪酮的交叉反应分别为 100%, 10%, 7.1%, 1.4% 和 0; H_2BSA 抗体分别为 44.6%, 100%, 0.31%, 0.25% 和 0; H_3BSA 抗体分别为 50.1%, 8.9%, 100%, 25.1% 和 0.08%。对五种非三氮苯类除草剂丁草胺、氟乐灵、麦草畏、甲草胺、氟磺胺草醚均无交叉反应。

关键词: 酶联免疫吸附测定; 三氮苯类除草剂; 残留分析

中图分类号: S482.42

三氮苯类除草剂是全球最大吨位除草剂之一,以莠去津(2-氯-4-乙胺基-6-异丙胺基-1,3,5-三氮苯),西玛津(2-氯-4,6-二乙胺基-1,3,5-三氮苯),扑草净(4,6-二异丙胺基-2-甲硫基-1,3,5-三氮苯)为代表,主要用于防除玉米、棉花、水稻等作物的杂草。我国于70年代后期开始生产,至今已广泛应用。但是三氮苯类除草剂在环境中比较稳定,半衰期长,极易污染土壤和地下水源。近年来,在我国华北地区由于玉米地大量使用莠去津,对下茬作物小麦等的药害问题已日益突出。另外,三氮苯类除草剂的含亚硝基衍生物和其他代谢产物潜在的致畸、致癌和致突变性也日益引起人们的关注。因此开发一种简单、快速,适于农药残留现场监控的痕量分析方法具有重要的现实意义。

检测三氮苯类除草剂残留量的常规方法有气相色谱法^[1,2]和高效相色谱法^[3,4]等。这些方法虽能达到残留分析的要求,但样本前处理过程复杂,工作量大,仪器昂贵等问题,而ELISA方法灵敏度高,特异性强,样本前处理简单,操作简便,便于进行现场监控,可以与常规分析方法互为补充^[5]。近10年来它在农药残留分析领域的应用已越来越广泛,国外已有很多这方面的文献报道,其中包括三氮苯类除草剂如莠去津^[6,7]、氟草津和去草净^[8]。但在我国这方面的研究则刚刚开始,仅见有对硫磷ELISA方法的报道^[9]。

本文根据三氮苯类除草剂的结构特征,从三氮苯的不同部位引入活性基团,合成了三种不同的抗原和相应的抗体,建立了可用于检测莠去津,西玛津、扑草净的ELISA方法。

收稿日期: 1995-06-23

* 国家自然科学基金资助项目

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

1.1.1 实验材料 莠去津等农药标样(农业部农药检定所);三聚氰氯(>99%)(吉林农药厂);牛血清白蛋白(BSA),卵清蛋白(OVA),巯基丙酸,巯基己酸,N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),二环己基碳二亚胺(DCC)(为Sigma公司产品);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔抗体(酶标二抗),正常羊血清,正常兔血清,弗氏不完全佐剂(FIA),弗氏完全佐剂(FCA)(北京生物制品所)。

磷酸缓冲液(PBS): $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.2。

包被液: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液, pH9.6。

血清稀释液: $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS加5%正常羊血清。

洗涤液(PBST): $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS含0.1%吐温20, pH7.2。

封闭液:洗涤液加1%低脂奶粉和5%正常羊血清。

底物溶液: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH5.0)内含 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 邻苯二胺,临用前按 $0.4 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加过氧化氢。

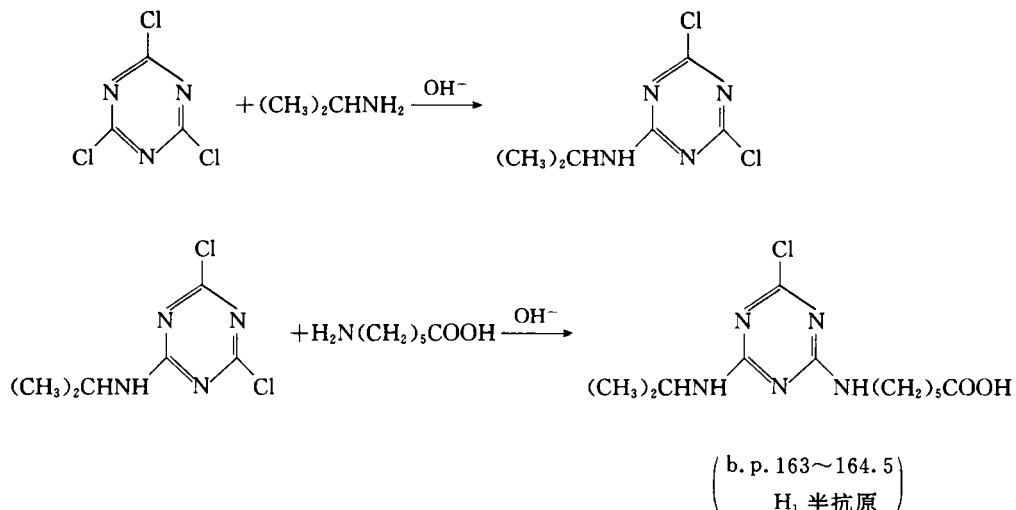
实验动物为新西兰青紫蓝兔。

1.1.2 仪器 酶联免疫测定仪,紫外分光光度计。

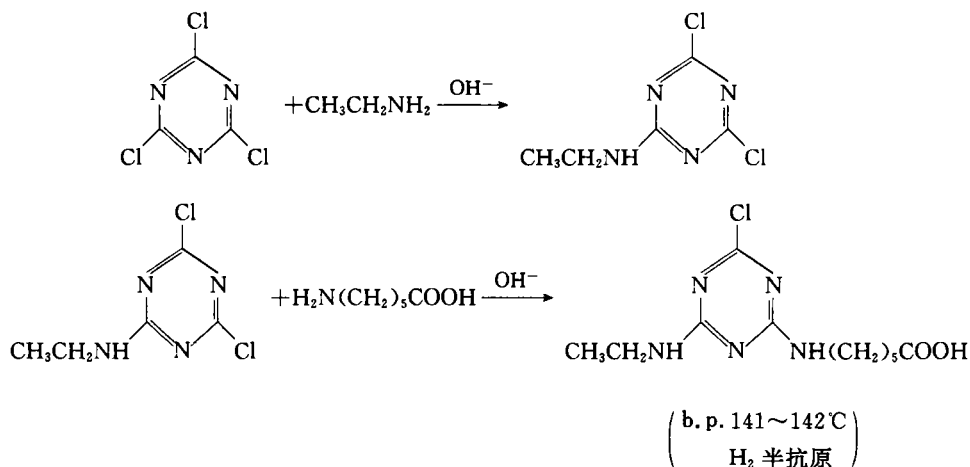
1.2 抗原的制备

1.2.1 半抗原的合成 由于常见的三氯苯类除草剂分子本身不具可直接与蛋白质偶联的活性基团,本文以莠去津为模板,以三聚氰氯为起始原料,分别从均三氯苯环的2,4,6三个不同部位引入活性羧基。为使半抗原分子与蛋白质偶联后,尽可能地暴露于载体表面,易于被动物机体识别,要求在半抗原与载体蛋白之间有一个3~6个碳链的间隔臂^[5],选择了分别以巯基己酸、巯基丙酸取代莠去津三氯苯环上的乙基、异丙基和氯原子,得半抗原H₁,H₂,H₃。

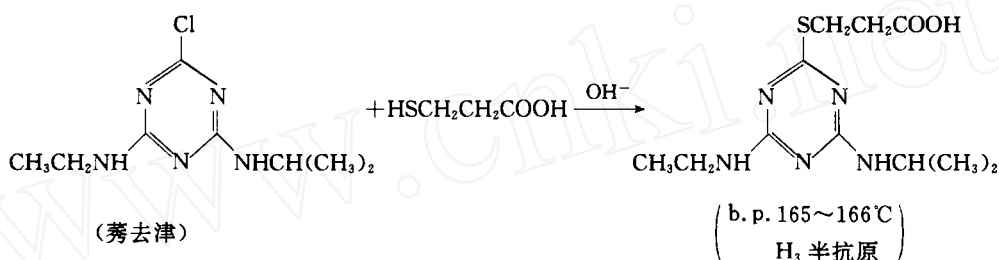
半抗原H₁的合成反应式如下:



半抗原 H₂ 的合成反应式如下:



半抗原 H₃ 的合成反应式如下:



纯化后的三个半抗原经核磁共振仪、红外光谱仪、质谱仪鉴定其结构,加以确证。

1.2.2 半抗原与蛋白质的偶联 取 4.1 mmol 半抗原(H₁, H₂或 H₃),溶于 1.5 mL DMF,加入 0.4 mmol NHS 和 0.44 mmol DCC,于室温反应 3 h,离心将上清液分两等份备用。

分别称取 50 mg BSA 和 36 mg OVA 于两个反应瓶中,各加 10 mL 蒸馏水溶解,并在搅拌下分别逐滴加入一等份上述上清液,18℃反应过夜,反应液用 PBS 透析 48 h,用紫外分光光度法测定抗原结合比。于-20℃冰箱保存。

半抗原与 BSA 的偶联复合物用作免疫抗原,与 OVA 的复合物作为包被抗原。

1.3 抗体的制备 实验动物用卡介苗致敏两周后,进行基础免疫,免疫剂量为 0.25 mg·kg⁻¹,抗原用生理盐水稀释,加等体积的弗氏完全佐剂,乳化后,注射腭窝淋巴和背部皮下。一个月后,进行加强免疫,剂量为 0.5 mg·kg⁻¹,抗原用生理盐水稀释,加等体积弗氏不完全佐剂,于背部皮下多点注射,以后每两周按同样的剂量和方法注射一次。从第三次免疫开始,每次注射后第 8 d,从兔子的耳缘静脉采血,测定抗体效价及特异性。

1.4 三氯苯类除草剂的 ELISA 测定方法 采用间接竞争酶联免疫分析方法。其测定原理是将农药与大分子载体偶联制得的包被用抗原吸附于固相载体上,制备成固相抗原,然后加入相应抗体和待测农药,固相抗原中的农药,待测农药与抗体进行竞争结合反应,待测农药含量多,则被结合在固相抗原上的抗体少,反应后加入酶标二抗(只能与被结合在固相抗原上的抗体特异结合),最后用酶的底物进行显色加以测定。当抗体量一定时,加入的待检农药量越多,与固相抗原结合的抗体就越少,发色反应减弱,抑制率增高;反之,则发色反应增强,

抑制率减低。因而可根据已知量农药的标准曲线和待检样品的抑制率,推算出待测农药的浓度。

1.4.1 标准曲线的制备 96孔聚苯乙烯微量滴定板经蒸馏水洗涤后,加入含包被抗原的包被液($5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) $200\mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$, 37°C 温育2h。将包被液吸干并用蒸馏水洗涤后,加封闭液 $200\mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$, 37°C 温育1h。封闭好的板吸干后,每孔加入系列已知浓度除草剂的PBS溶液 $100\mu\text{L}$,再加入定量的抗血清液 $100\mu\text{L}$,混匀后,在 37°C 温育45min,弃去孔内液体,用洗涤液洗板5次,每孔加入1:4万倍稀释的酶标二抗 $100\mu\text{L}$,将板在 37°C 温育1h,用洗涤液洗5次后,每孔再加入底物液 $100\mu\text{L}$,室温避光反应30min后,用 $50\mu\text{L}$ 终止液($1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸)终止反应。在酶联仪上测定490nm的吸光值。根据抑制率与农药浓度的对数作图即得标准曲线。

测定不同除草剂时,选用相应抗原和抗体:用 H_1OVA 固相抗原及 H_1BSA 抗体测定莠去津;用 H_2OVA 固相抗原及 H_2BSA 抗体测定西玛津;用 H_3OVA 固相抗原及抗 H_2BSA 抗体测定扑草净。

1.4.2 方法的特异性 利用所建立的方法对各种结构类似物进行测定,测出它们抑制50%所需的浓度,再根据下式算出交叉反应率。

以 H_1BSA 抗体(测莠去津)为例

$$\text{交叉反应率} = \frac{\text{抑制率为50\%时莠去津的浓度}}{\text{抑制率为50\%时其他农药的浓度}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 抗原结合比 根据半抗原-蛋白质结合物在紫外区域的吸收约等于游离蛋白质和半抗原的吸光值的简单加和的特点,可以通过测定三者分别在280nm和260nm的吸光值推算其可能的结合比。测定结果如下:

$$\text{H}_1\text{-BSA} \quad 6:1, \quad \text{H}_2\text{-BSA} \quad 10:1, \quad \text{H}_3\text{-BSA} \quad 8:1$$

$$\text{H}_1\text{OVA} \quad 14:1, \quad \text{H}_2\text{-OVA} \quad 12:1, \quad \text{H}_3\text{-OVA} \quad 6:1$$

2.2 抗体的效价及抗体与不同抗原的反应性 6只兔子分别用三种抗原免疫4~5次,得到的抗血清的终点效价(阳性孔与阴性对照孔吸光值之比大于2.1)均大于12.8万倍,工作效价(指 $1/2 OD_{\text{max}}$ 处的血清稀释度)均在3.2万倍以上。

图1~3是三种抗体与三种不同固相抗原(H_1OVA , H_2OVA , H_3OVA)的交叉反应性。从图可以看出,各抗体在对应的抗原上均显示出最强的反应性(H_3BSA 抗体与 H_2OVA 和 H_3OVA 的反应有所交替,但基本趋势是一致的),这表明了抗体抗原结合反应对化学结构的高度特异性。

2.3 ELISA 方法的标准曲线 ELISA 方法的标准曲线以抑制率与农药浓度的半对数曲线表示(图4),抑制率以下式计算:

$$\frac{(OD_{\text{max}} - OD_{\text{min}}) - (OD_x - OD_{\text{min}})}{OD_{\text{max}} - OD_{\text{min}}} \times 100\%$$

式中: OD_{max} 为不加药时的吸光值, OD_x 为农药浓度为 x 时的吸光值, OD_{min} 为空白对照孔的吸光值。

由标准曲线可看出, H₁BSA 抗体测莠去津时, 抑制率 50% 时莠去津的检出浓度为 27 ng · mL⁻¹, 最低检测限(以直线部分最低点的浓度表示)为 1 ng · mL⁻¹ H₂BSA 抗体测西玛津时, 抑制率 50% 时的检出浓度为 14 mg · mL⁻¹ 检测极限为 0.5 ng · mL⁻¹ H₃BSA 抗体测扑草净时, 抑制率 50% 时的检出浓度和检出极限分别为 76 ng · mL⁻¹ 和 2 ng · mL⁻¹。

2.4 方法的特异性 为了检验方法的特异性, 用三种不同的抗体及所建立的方法测定了莠去津、西玛津、扑草净、西草净、环嗪酮和非三氮苯类 5 种除草剂(见附表)。

由附表可以看出, 抗 H₁BSA 抗体表现出对莠去津的高度特异性, 即使结构十分相近的西玛津和扑草净也只有 10% 和 7.1% 的交叉反应率, 其余被测农药则基本无交叉反应, H₂-BSA 抗体对西玛津特异, 而莠去津由于其结构十分相似, 有 44.6% 的交叉反应。H₃BSA 抗体与扑草净的反应最强, 但对莠去津和西玛津也表现出一定的识别能力, 分别为 50.1% 和 25.1%。这充分表明抗体的特异性与相应的免疫抗原的结构密切相关, 它们对被测物的化学结构极为敏感, 其结构上的微小变化都可引起抗体的交叉反应性的很大差异。

3 结论

根据三氮苯类除草剂的结构特征, 合成了三种活性半抗原, 由它们制成的免疫抗原进行免疫, 获得了三种高效价抗体, 其工作效价均大于 3.2 万倍, 远高于国外同类方法 4 000 ~ 8 000 倍的水平^[7,10]。根据三种抗体的特异性, 建立了三者测定莠去津、西玛津、扑草净的 ELISA 方法。虽然 H₂BSA 抗体和 H₃BSA 抗体的特异性不及 H₁BSA 抗体, 但仍有很大的实际应用价值。一方面 H₂BSA 抗体可以作为同时检测西玛津, 莠去津总量的有效手段, 在没有

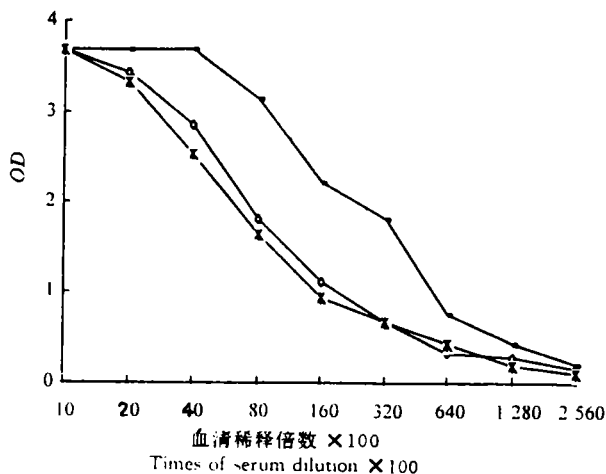


图 1 抗 H₁BSA 抗体与不同包被抗原的结合反应
Fig.1 Antisera dilution curves for anti-H₁BSA serum from rabbits exposed to three coating antigens

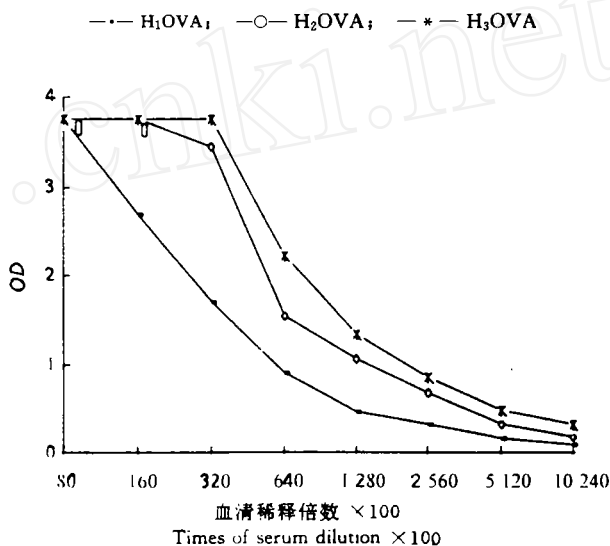


图 2 抗 H₂BSA 抗体与不同包被抗原的结合反应
Fig.2 Antisera dilution curves for anti-H₂BSA serum from rabbits exposed to three coating antigens

--- H₁OVA; —○— H₂OVA; - * - H₃OVA

使用西玛津的地区,可直接用于检测莠去津,H₃BSA 抗体也可同样应用。另一方面,扑草净多在南方水田使用,而莠去津多用于北方旱田,且我国目前常用的主要是莠去津,因此,该抗体在北方大部地区还可用于检测莠去津的残留水平。

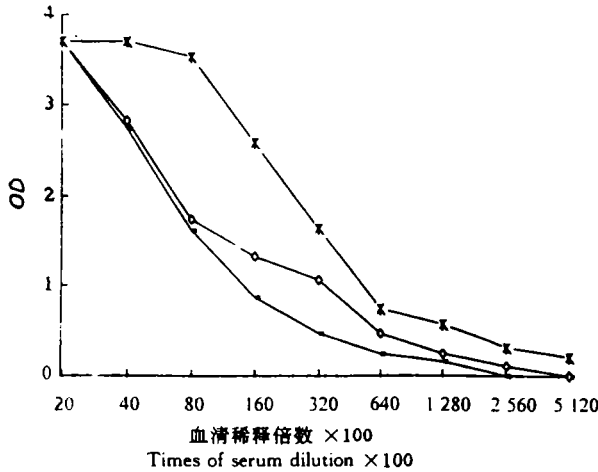


图 3 抗 H₃BSA 抗体与不同包被抗原的结合反应

Fig. 3 Antisera dilution curves for anti-H₃BSA serum from rabbits exposed to three coating antigens
—●— H₁OVA; —□— H₂OVA; —*— H₃OVA

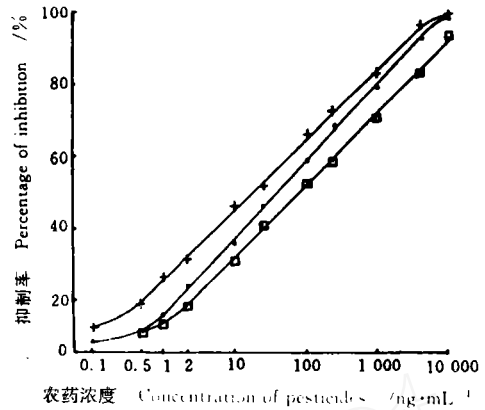


图 4 三种抗体测定农药的标准曲线

Fig. 4 Standard curves for three herbicides

—●— 抗 H₁BSA 抗体测莠去津(for atrazine),
—□— 抗 H₂BSA 抗体测西玛津(for simazine),
—■— 抗 H₃BSA 抗体测扑草净(for prometryne).

附表 三种抗体与不同农药的交叉反应率

/%

Table Cross-reactivity of three antibodies toward 10 herbicides

农药名称 Kind of pesticide	H ₁ BSA	H ₂ BSA	H ₃ BSA
莠去津 (Atrazine)	100	44.6	50.1
西玛津 (Simazine)	10.0	100	8.9
扑草净 (Prometryne)	7.1	0.31	100
西草净 (Simetryne)	1.4	0.25	25.1
环嗪酮 (Hexazinone)	<0.01	<0.01	0.08
西草胺 (Butachlor)	<0.01	<0.01	<0.01
氟乐灵 (Triflualin)	<0.01	<0.01	<0.01
麦草畏 (Alachlor)	<0.01	<0.01	<0.01
甲草胺 (Fomesafen)	<0.01	<0.01	<0.01
氟磺酰草胺 (Dicamba)	<0.01	<0.01	<0.01

参 考 文 献

1 Roseboom H, Herbold H A. Determination of triazine herbicides in various crops by capillary gas chromatography with thermionic detection. J Chromatogr, 1980, 202: 431~438

- 2 Bailey R, LeBEL G. Gas chromatography of triazine herbicide as heptafluorobutyryl derivatives and some applications to analysis in foods. *J Chromatogr*, 1978, 161: 251~257
- 3 Vermeulen N M J, Apostolides Z, Potgieter D J J. Separation of atrazine and some of its degradation products by HPLC. *J Chromatogr*, 1982, 240: 247~253
- 4 Vickrey T M, Karlesky D L, Blackmer G L. Colorimetry and HPLC of atrazine residues in soil, comparison of methods. *J AOAC*, 1980, 63: 506~510
- 5 Jung F, Gee S J, Harrison R O, Goodrow M H, Karu A E, et al. Use of immunochemical techniques for the analysis of pesticides. *Pesticide Science*, 1989, 26: 303~317
- 6 Bushwqy R J, Perkin B, Savage S A, Lekousi S J, Ferguson B S. Determination of atrazine residues in water and soil by enzyme immunoassay. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1988, 40: 647~654
- 7 Dunbar B, Riggle B, Niswender G. Development of enzyme immunoassay for the detection of triazine. *J Agric Food Chem*, 1990, 38: 443~437
- 8 Huber S T, Hock B. A solid-phase enzyme immunoassay for quantitative determination of the herbicide terbutryn. *J Plant Dis Protection*, 1985, 92: 147~156
- 9 刘长武, 王一茹, 李治祥, 张俊亭. 对硫磷的人工抗原合成与鉴定. *环境科学学报*, 1992, 12: 377~381
- 10 Goodrow M H, Harrison R O, Hammock B D. Hapten synthesis, antibody development, and competitive enzyme immunoassay for S-triazine herbicide. *J Agric Food Chem*, 1990, 38: 990~996

Study on Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Residue Determination of Triazine Herbicides

Shan Guomin Qian Chuanfan

(Dept. of Applied Chemistry, CAU, Beijing 100094)

Guo Qinyuan Cheng Ming Su Qiaoling

(National Vaccine and Serum Institute)

Abstract: The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting triazine herbicides was studied. Three bioactive antigens were synthesized and three high titre antisera were prepared. The ELISA for residue analysis of atrazine, simazine, prometryne was established. Their limits of detection were $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ and $2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. The cross-reaction of anti-H₁BSA serum to atrazine, simazine, prometryne, simetryme, hexazinone was 100%, 10%, 7.1%, 1.4% and 0 respectively; of anti-H₂BSA serum was 44.6%, 100%, 0.31%, 0.25% and 0 respectively; of anti-H₃BSA serum was 50.1%, 8.9%, 100%, 25.1%, and 0.08% respectively. Five non-triazine herbicides butachlor, triflualin alachlor, fomesafen, dicamba were tested and there was no cross-reaction between them.

Key words: enzyme linked immunosorbent assay; triazine herbicides; residue analysis