

毒死蜱单克隆抗体的制备及 ELISA 检测方法研究

王璇, 王亚, 刘冉, 浦跃朴, 尹立红

摘要: [目的] 制备毒死蜱单克隆抗体, 为建立毒死蜱残留检测方法奠定基础。[方法] 以毒死蜱原药与 3-巯基丙酸为起始原料, 合成半抗原并对其进行结构鉴定。利用该半抗原与牛血清蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)偶联制备毒死蜱人工免疫抗原和包被抗原, 再取已免疫的经过筛选的 Balb/c 小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合, 用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 方法对 2 株细胞进行鉴定, 并测定与其他农药的交叉反应率。[结果] 获得两株稳定分泌毒死蜱单克隆抗体的细胞株, 其检测范围为 0.04~0.42 mg/L, 半数抑制浓度为 0.135 mg/L, 最低检测限为 0.03 mg/L, 与杀螟硫磷、对硫磷和马拉硫磷几乎没有交叉反应。[结论] 成功制备两株分泌毒死蜱抗体的单克隆细胞株, 初步建立了毒死蜱间接 ELISA 检测方法。

关键词: 毒死蜱; 人工抗原; 单克隆抗体; 酶联免疫吸附试验

Preparation of Monoclonal Antibody against Chlorpyrifos and Development of ELISA for Detection of Chlorpyrifos Residues WANG Xuan, WANG Ya, LIU Ran, PU Yue-pu, YIN Li-hong (School of Public Health/Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering of Ministry of Education, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China). Address correspondence to YIN Li-hong, E-mail: lhyin@seu.edu.cn

Abstract: [Objective] To produce monoclonal antibodies (McAb) against chlorpyrifos and to establish a rapid assay for detecting the residues of chlorpyrifos. [Methods] Hapten of chlorpyrifos was synthesized by technical grade imidacloprid reacted with 3-mercaptopropionic acid and the structure of synthesized product was identified. Then, the hapten was covalently conjugated to bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) to prepare immunogen and coating antigen. Two hybridoma cell lines secreting McAb against chlorpyrifos were established by fusing mouse myeloma cells SP2/0 and splenocytes from the Balb/c mouse immunized with immunogen. Two cell lines were identified by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect competitive ELISA; cross-reactivity with other organophosphate pesticides was also tested. [Results] Two monoclonal cell lines that secreted Chlorpyrifos antibodies steadily were obtained. Based on the calibration curve, the range of detection was 0.04-0.42 mg/L, the median inhibitory concentration was 0.135 mg/L, and the limit of detection was 0.03 mg/L. No cross-reactivity of the antibody with sumithion, parathion and malathion was observed. [Conclusion] Two chlorpyrifos monoclonal antibody cell lines are prepared successfully. A ELISA is preliminarily developed using the monoclonal antibody to detect chlorpyrifos.

Key Words: chlorpyrifos; artificial antigen; monoclonal antibody; enzyme-linked immunosorbent assay

我国是世界第二大农药生产国, 同时也是第一大农药消费国。随着各种农药在农业生产及日常生活的广泛应用, 农药残留引起环境污染的事件日益增多, 因此农药污染问题成为急需监测、治理的焦点之一。既往农药的检测多采用气相色谱法、液相色谱法等^[1], 这些方法需要昂贵的仪器设备、训练有素的技术人员, 消耗试剂多, 检测成本高, 而且检测时间长, 不利于现场监测。农药的免疫检测技术因具有快速、灵敏、特异性高等优点而引起相关研究人员和科研机构的重视, 成为农药检测中一种简便、样品通量大、检测费用低廉、适用现场

监测的分析方法^[2-3]。毒死蜱(chlorpyrifos)是一种高效、广谱、中等毒性的有机磷类杀虫剂, 具有触杀、胃毒和熏蒸三种作用方式, 是防治粮食、蔬菜和其他经济作物害虫的理想杀虫剂, 但它同时也对农田环境及有益生物产生危害^[4], 新近的流行病学调查发现毒死蜱与肺癌的发生可能存在某些联系, 而且有研究显示其极可能具有内分泌干扰作用^[5]。随着国内甲胺磷、久效磷、甲基对硫磷、对硫磷等高毒有机磷农药的禁用, 毒死蜱逐渐代替高毒农药, 应用范围越来越广, 其污染检测问题也随之而来。建立毒死蜱的免疫检测方法, 可以有效地对毒死蜱残留进行监控分析, 减少毒死蜱中毒事件的发生。本研究拟通过合成毒死蜱人工抗原、制备毒死蜱单克隆抗体等步骤, 建立毒死蜱间接 ELISA 检测方法。

[基金项目] 教育部博士点基金(编号: 200802860025), 江苏省预防医学基金(编号: Y200730)

[作者简介] 王璇(1985—), 女, 博士生; 研究方向: 环境医学; E-mail: wangwangshi_55@163.com

[通信作者] 尹立红教授, E-mail: lhyin@seu.edu.cn

[作者单位] 东南大学公共卫生学院, 环境医学工程教育部重点实验室, 江苏 南京 210009

1 材料与方法

1.1 试验动物与细胞

Balb/c 小鼠, 6~8 周龄, 雌性(购自扬州大学实验动物中

心);小鼠骨髓瘤细胞系 SP2/0(东南大学遗传学研究中心提供)。

1.2 主要试剂

弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂(美国 Sigma 公司),辣根过氧化物酶-羊抗小鼠免疫球蛋白(HRP-IgG,南京生兴生物技术公司),RPMI-1640 基础培养基(德国 Gibco 公司),小牛血清(fetal calf serum, FCS, 杭州四季青公司),20%(体积分数)小牛血清 RPMI-1640 培养基、氨基嘌呤(A)贮存液、次黄嘌呤(H)和胸腺嘧啶核苷(T)贮存液、HAT 培养基、HT 培养基、青霉素溶液、链霉素溶液、聚乙二醇 1500(PEG1500)、磷酸盐缓冲液(PBS)、包被液、洗涤液(PBS-T)及稀释液、封闭液、底物溶液(四甲基联苯胺, TMB)、毒死蜱样品溶液、正辛酸(分析纯,上海化学试剂公司),25%~28%(体积分数)浓氨水(分析纯,上海化学试剂公司),杀螟硫磷、对硫磷、马拉硫磷标准品(江苏省疾病预防控制中心惠赠),60 mmol/L 乙酸缓冲液、饱和硫酸铵溶液、毒死蜱溶液。

1.3 主要仪器

Ultraspec-4000 型紫外(可见)分光光度计(Pharmacia Biotech 公司),HJ-3 型电磁搅拌器(常州国华电器有限公司),SCR20BC 型低温离心机(日本 HITACHI 公司),DOA-P181-BN 型抽气泵(美国 Gelman 公司),SK-1 型快速混匀器(常州国华电器有限公司),TGL-16 型高速台式离心机(上海医用分析仪器厂),LD5-2A 型低速离心机(北京医用离心机厂),SW-CJ-2F 型净化工作台(苏州安泰空气技术有限公司),IX51 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),5400 型 CO₂ 培养箱(美国 NAPCO 公司)。

1.4 毒死蜱完全抗原的合成与鉴定

1.4.1 半抗原合成 称取 3-巯基丙酸(0.01 mol)1.06 g 于三口平底烧瓶,用 50 mL 无水乙醇溶解,加入 NaOH 1.0143 g,在磁力搅拌器上加热搅拌反应,直至溶解。再加入溶于 50 mL 无水乙醇的毒死蜱原药 3.51 g(10 mmol),60℃下回流反应 2 h,过滤反应混合物,减压浓缩^[6]。然后用 5 g/mL NaHCO₃ 溶液 50 mL 将残留物转移到分液漏斗中,正己烷(50 mL)萃取 2 次,弃去有机相。然后用浓盐酸调水相 pH 至 3 左右,二氯甲烷(50 mL)萃取 3 次,有机相过无水 Na₂SO₄,减压浓缩近干,得棕红色油状物,柱层析过硅胶柱,收集洗脱液(正己烷:乙酸乙酯,1:2)的流动相,减压浓缩近干。加入少量无水乙醇溶解产物,重结晶后得到浅黄色晶体。合成路线见图 1。

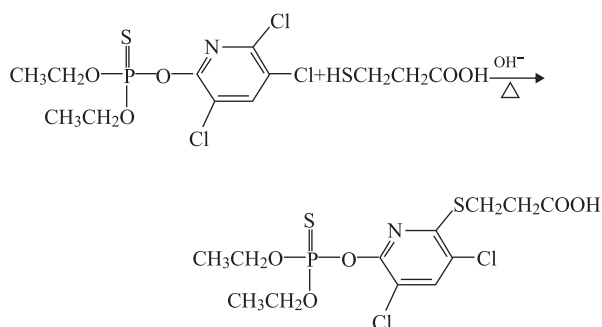


图 1 毒死蜱半抗原合成路线

Figure 1 Reaction scheme of synthesizing chlorpyrifos hapten

1.4.2 人工抗原的合成 将 0.0843 g(半抗原 200 μmol)溶于 2 mL N,N-二甲基甲酰胺中,然后加入等当量的二环己基碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺,室温下磁力搅拌反应过夜,离心收集上清液后,取 500 μL 上清液加入 6 mL 0.2 mol/L 硼酸盐缓冲液(pH9.0)溶解的 10 g/L 牛血清白蛋白(BSA)溶液中,常温磁力搅拌下反应 4 h;另取 500 μL 上清液加入到 7 mL 0.2 mol/L 硼酸盐缓冲液(pH9.0)溶解的 15 g/L 卵清蛋白(OVA)溶液中,常温磁力搅拌下反应 2 h。前者合成物为免疫抗原,后者为包被抗原^[6-7]。

1.4.3 纯化与鉴定合成抗原 凝胶过滤层析法纯化免疫抗原和包被抗原,冷冻干燥,-20℃保存。紫外吸收光谱法^[8]鉴定合成抗原,钼兰比色法测定毒死蜱人工抗原结合比。

1.5 毒死蜱单克隆抗体的制备

按常规方法免疫小鼠^[9-10],然后进行细胞融合,采用间接 ELISA 与竞争 ELISA 联合应用的方法对杂交瘤进行筛选,对特异性抗体阳性孔的杂交瘤细胞以有限稀释法进行克隆和亚克隆,以获得稳定的单克隆杂交瘤细胞株。扩大培养筛选出的单克隆杂交瘤细胞株,使用 Balb/c 小鼠体内诱生腹水的方法大量制备单克隆抗体。采用正辛酸-硫酸铵沉淀法(CAASP)纯化抗体。

1.6 间接竞争 ELISA 方法的建立

1.6.1 抗原抗体浓度的选择 通过方阵法确定抗原抗体工作浓度,分别用 0.1、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/L 质量浓度的包被抗原分组包被酶标板,每孔 100 μL,4℃冰箱包被过夜。封闭后,将纯化后的单克隆抗体用 PBS-T 液分别稀释至 0.1、0.2、0.4、1.0、2.0 mg/L,每孔 50 μL 分组对应加入封闭后的酶标板,随后每孔加入 50 μL PBS-T 液,37℃温箱中温育 1 h。另设两孔阴性血清(1:100 倍稀释)和空白对照(PBS-T)。甩干酶标板,洗涤液 PBS-T 洗涤 3 次,每次 5 min,吸水纸拍干。加入 PBS-T 溶液 1:5000 倍稀释的辣根过氧化物酶-羊抗小鼠 IgG,每孔 100 μL,37℃温箱中孵育 1 h。洗板后,每孔加入临用前配的底物(TMB)溶液 100 μL,避光置 37℃温箱 15 min,每孔加 50 μL 2 mol/L 的硫酸(H₂SO₄)终止反应。酶标仪上测定 450 nm 波长处的各孔光密度值。

1.6.2 标准曲线的建立 用选定工作浓度的包被抗原包被酶标板,每孔 100 μL,4℃包被过夜。待封闭酶标板后每孔加入 50 μL 抗体稀释液,随后分组加入 50 μL 一系列梯度质量浓度(简称“浓度”)的毒死蜱溶液(10⁻³~10² mg/L)及作为对照的 PBS-T 溶液,每一浓度的毒死蜱溶液设 3 个平行样,37℃温箱中温育 1 h,间接竞争 ELISA 试验毒死蜱对单克隆抗体的抑制标准曲线。酶标仪测定结果光密度后,以毒死蜱浓度为横坐标(以对数刻度形式表示),抑制率为纵坐标作标准抑制曲线,求出毒死蜱对单克隆抗体的抑制回归方程和半数抑制浓度 IC₅₀ 值(即当抑制率为 50% 时的毒死蜱浓度)。其中:抑制率=(上述加不同毒死蜱浓度孔的光密度值的 3 孔平均值)/(对照孔的光密度值的 3 孔平均值)×100%。

1.6.3 单克隆抗体特性鉴定 取克隆化后的细胞株培养上清检测,分别用 0.5 μg 的羊抗鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 包被酶标板,间接 ELISA 鉴定单克隆抗体亚类。

1.6.4 交叉反应性 按照毒死蜱间接竞争 ELISA 试验检测条件分别对杀螟硫磷、对硫磷和马拉硫磷等与毒死蜱结构相似的有机磷类农药进行交叉反应实验。将上述农药按一定浓度梯度稀释,建立它们的抑制标准曲线,并计算各自的 IC_{50} ,按下述公式计算交叉反应率:

$$\text{交叉反应率} = (\text{毒死蜱对单克隆抗体的 } IC_{50} / \text{其他试验农药的 } IC_{50}) \times 100\%$$

表 1 合成抗原的紫外吸收光谱测定

Table 1 Ultraviolet spectra of artificial antigens

抗原 Antigen	光密度 ($n=3$) Density	磷浓度 (mg/L) P concentration	毒死蜱半抗原相对分子质量 Relative molecule weight of chlorpyrifos haptane	蛋白质浓度 (mg/L) Protein concentration	蛋白质相对分子质量 Relative molecule weight of chlorpyrifos haptane	结合比 Ratio of conjugation
免疫抗原 Immunogen	0.060	0.1514	421	2500	66200	1 : 64
包被抗原 Coating antigen	0.023	0.0696	421	2500	42700	1 : 19

2.2 毒死蜱半抗原与载体蛋白结合比的测定

以系列浓度的磷标准液的光密度值为纵坐标、磷浓度为横坐标,作出标准曲线,得到光密度值对磷浓度的回归方程 $\hat{y}=0.4525x-0.0085$,见图 2。随后根据回归方程求出完全抗原溶液的磷浓度,按式计算合成抗原中磷含量及偶联结合比。免疫抗原和包被抗原中载体蛋白与毒死蜱偶联结合比分别为 1 : 64 和 1 : 19。

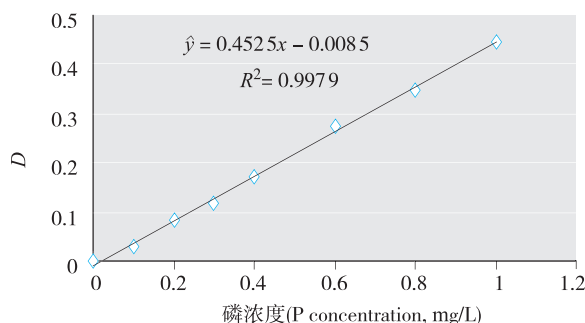


图 2 标准曲线
Figure 2 Standard curve

2.3 毒死蜱单克隆抗体的制备

细胞融合 5~7 d 左右,倒置显微镜下可见大量未融合的细胞明显退化、缩小,逐渐死亡,并可见有小的杂交瘤细胞克隆出现,杂交瘤细胞大、圆且透亮,以后克隆逐渐长大,约两周后可长至培养孔底 1/5 以上。融合细胞一共接种 151 孔,其中 44 孔有杂交瘤细胞生长,融合率为 29.14%。间接 ELISA 检测,阳性细胞孔 5 孔,阳性率为 3.31%,阳性孔与阴性血清孔的光密度值之比最高达到 12。

对筛选出的 5 孔阳性孔细胞进行竞争抑制实验,挑选出其中阳性光密度值较高、抑制效果较明显的细胞进行有限稀释法克隆或亚克隆,最终得到 2 株能稳定分泌毒死蜱抗体的单克隆杂交瘤细胞株。间接 ELISA 表明,2 株细胞分泌的抗毒死蜱单克隆抗体均为 IgG1 型蛋白。

2.4 间接 ELISA 试验最适工作浓度

用方阵试验对间接竞争 ELISA 法的抗原、抗体的工作浓度

2 结果

2.1 毒死蜱完全抗原鉴定

紫外扫描光谱结果 (200~360 nm) 见表 1,合成的免疫抗原和包被抗原与载体蛋白 BSA、OVA 相比,最大吸收波长发生明显的变化,向远紫外区偏移;免疫抗原和包被抗原与毒死蜱半抗原最大吸收波长也不一致,这表明合成抗原与载体蛋白及毒死蜱半抗原不是同一种物质,间接说明人工抗原的合成是成功的。

进行筛选和确定,结果见表 2。挑选能使光密度值在 1.0 左右而本身值均较小的抗原和抗体的浓度作为间接 ELISA 试验的工作浓度。由表 4 选择间接竞争 ELISA 试验的最适工作浓度是:包被抗原为 1 mg/L,抗体为 0.4 mg/L。

表 2 间接竞争 ELISA 法中抗原抗体的最适工作浓度方阵试验结果

Table 2 Experimental results for proper concentrations of Ag/Ab by indirect ELISA

包被抗原 (mg/L) Coating antigen	抗体浓度 (mg/L) Antigen concentration				
	0.1	0.2	0.4	1.0	2.0
0.1	0.069	0.091	0.102	0.195	0.426
0.5	0.132	0.326	0.535	0.752	0.921
1.0	0.401	0.691	0.982	1.135	1.352
2.0	0.652	0.890	1.112	1.303	1.538
4.0	0.798	1.117	1.275	1.467	1.721

2.5 毒死蜱对纯化后抗体的抑制曲线和检测灵敏度

以系列浓度的毒死蜱溶液做间接竞争 ELISA 试验,根据抑制率与毒死蜱浓度之间的关系作图,得标准曲线,见图 3。根据回归方程 $\hat{y}=-0.2669 \ln(x)-0.0347$ ($R^2=0.9859$),见图 4,得出其半数抑制浓度 IC_{50} 为 0.135 mg/L,线性检测范围为 0.04~0.42 mg/L,最低检测限为 0.03 mg/L。

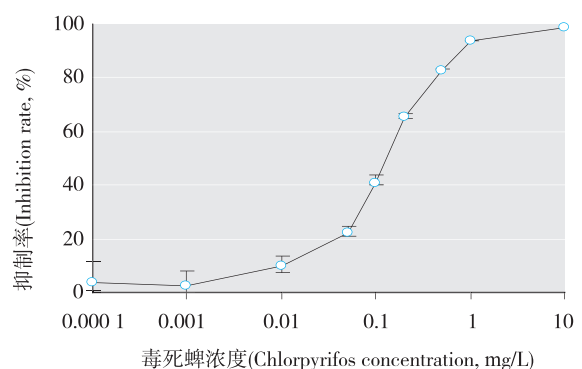


图 3 纯化后单克隆抗体对毒死蜱的抑制标准曲线

Figure 3 Chlorpyrifos competitive inhibition curve for monoclonal antibody

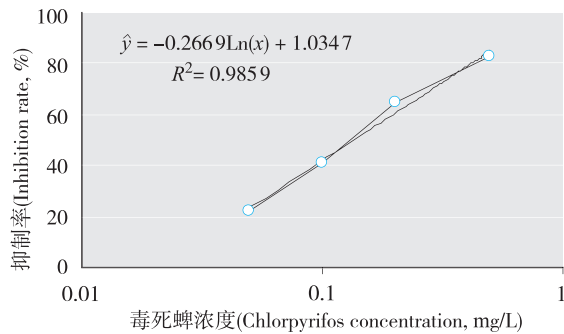


图4 单克隆抗体对毒死蜱的抑制标准曲线

Figure 4 Chlorpyrifos competitive inhibition curve for monoclonal antibody

2.6 单克隆抗体特异性研究

分别对毒死蜱及杀螟硫磷、对硫磷、马拉硫磷做间接竞争 ELISA 试验, 结果见表 3, 这 3 种农药与毒死蜱的交叉反应率分别小于 0.09%、0.14%、0.05%。

表 3 3 种有机磷农药与毒死蜱的交叉反应率

Table 3 Cross-reaction of monoclonal antibody with sumithion, parathion and malathion

农药 (Pesticide)	IC ₅₀ (μg/L)	交叉反应率 (Cross-reaction rate, %)
杀螟硫磷 (Fenitrothion)	> 139	< 0.09
对硫磷 (Parathion)	> 100	< 0.14
马拉硫磷 (Malathion)	> 230	< 0.05

3 讨论

本研究初步建立了检测毒死蜱残留量的间接竞争 ELISA 方法, 半数抑制浓度 IC₅₀ 为 0.135 mg/L, 最低检测限为 0.03 mg/L。与国外的相关研究结果比较^[9-10], 本研究 ELISA 试验的灵敏度相对偏低; 与国内的相关研究结果相比^[11], 灵敏度不相上下。与常规的仪器检测方法相比, 本方法具有检测快速, 样品前处理简单, 成本低, 特异性高等优点。特异性研究结果表明制备的单克隆抗体与杀螟硫磷、对硫磷和马拉硫磷 3 种与毒死蜱结构相似的有机磷类农药几乎没有交叉反应, 抗体特异性好。灵敏度与国外研究结果相比偏低的原因可能由于 ELISA 反应体系中影响因素较多, 而本研究仅对不同的包被抗原和抗体浓度方面进行了研究筛选, 可能尚没有摸索出 ELISA 的最佳反应条件。因此, 在本研究结果的基础上, 应进一步提高该方法的灵敏度, 对可能与毒死蜱产生交叉反应的甲基毒死蜱等农药进行特异性反应研究, 并对准确度、精密度和重复性做深入的系统

研究分析, 为进一步开发快速、简便检测毒死蜱的酶联免疫检测试剂盒奠定基础。

参考文献:

[1] QIAN GL, WANG LM, WU YR, et al. A monoclonal antibody-based sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (elisa) for the analysis of the organophosphorous pesticides chlorpyrifos-methyl in real samples [J]. Food Chem, 2009, 117(2): 364-370.

[2] SURI CR, BOROA R, NANGIAA Y, et al. Immunoanalytical techniques for analyzing pesticides in the environment [J]. TRAC, 2009, 28(1): 29-39.

[3] MOROZOVA VS, LEVASHOVA AI, ERMIN SA. Determination of pesticides by enzyme immunoassay [J]. J Analytical Chem, 2005, 60 (3): 202-217.

[4] 吴刚, 黄雅丽, 朱国念, 等. 有机磷杀虫剂毒死蜱的免疫化学分析方法研究 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(3): 382-386.

[5] ESKENAZI B, BRADMAN A, CASTORINA R. Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects [J]. Environ Health Perspect, 1999, 107(Suppl 3): 409-419.

[6] 朱国念, 吴刚, 吴慧明. 有机磷杀虫剂毒死蜱人工抗原的合成与鉴定 [J]. 中国农业科学, 2003, 36(6): 657-662.

[7] ZHU GN, GUI WJ, ZHENG ZT, et al. Synthesis and identification of artificial antigen for imidacloprid [J]. Agric Sci China, 2006, 5(4): 307-312.

[8] AHN KC, WATANABE T, GEE SJ, et al. Hapten and antibody production for a sensitive immunoassay determining a human urinary metabolite of the pyrethroid insecticide permethrin [J]. J Agric Food Chem, 2004, 28, 52(15): 4583-4594.

[9] MANCLUS JJ, PRIMO J, MONTTOYA A. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for the insecticide chlorpyrifos. 1. monoclonal antibody production and immunoassay design [J]. J Agric Food Chem, 1996, 44: 4052-4062.

[10] MANCLUS JJ, PRIMO J, MONTTOYA A. Development of enzymelinked immunosorbent assays for the insecticide chlorpyrifos. 2. assay optimization and application to environmental waters [J]. J Agric Food Chem, 1996, 44: 4063-4070.

[11] 吴雅欣, 许圆圆, 潘家荣. 毒死蜱单克隆抗体的制备及鉴定 [J]. 核农学报, 2009, 23(2): 341-344.

(收稿日期: 2011-03-15)

(英文编审: 薛寿征; 编辑: 王晓宇; 校对: 丁瑾瑜)