

甲基对硫磷 ELISA 分析方法的建立及初步应用

王刚焱¹, 何凤生¹, 鱼涛¹, 马兆扬¹, 王伯勋², 王玉萍¹

(1. 中国预防医学科学院劳动卫生职业病研究所, 北京 100050; 2. 湖北省沙隆达责任有限公司职工医院, 湖北 沙市)

摘要: 目的 探讨甲基对硫磷 (M1605) 简便、敏感、特异的免疫分析方法。方法 矩阵法选择好包被抗原和单克隆抗体最佳条件, 建立 M1605 间接竞争抑制 ELISA 检测法, 并分别检测 M1605 染毒小鼠和接触工人血清中 M1605 含量。结果 该方法线性范围为 5~500 ng/ml, 最低检出浓度为 5 ng/ml, 组内和组间变异系数不大于 11.5% 和 14.6%, 回收率平均为 96.2%。M1605 染毒小鼠和作业工人血清中 M1605 检出量及检出率与染毒剂量、检测时间及作业工种有关。结论 初步认为此法可用于 M1605 接触生物标志物的检测。

关键词: 甲基对硫磷; 单克隆抗体; 免疫分析

中图分类号: R139.3; R392.33 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2001)06-0327-04

Establishment and application of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of methylparathion

WANG Gang-duo¹, HE Feng-sheng¹, YU Tao¹, MA Zhao-yang¹, WANG Bo-xun², WANG Yu-ping¹

(1. Institute of Occupational Medicine, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100050, China; 2. Hubei Shalonda Co. Ltd Hospital, Shashi city, Hubei Province, China)

Abstract: **Objective** To establish enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of methylparathion (M1605). **Methods** Indirect competitive inhibition ELISA for the determination of M1605 was developed by using anti-M1605 McAb. The serum M1605 concentrations in mice treated with M1605 and in the workers exposed to M1605 were measured respectively by this method for the first time. **Results** The minimum detectable concentration of M1605 was 5 ng/ml and the standard curve was linear between 5 ng/ml and 500 ng/ml, the average recovery was 96.2%, and the coefficients of variation were not over 11.5% and 14.6% for intragroup assay and inter-group assay respectively. The serum M1605 concentrations in mice treated with M1605 and in workers exposed to M1605 were related with treated doses, and the time of exposure and measurement. **Conclusion** It seems that serum M1605 detected by immunoassay could be used as a biomarker of M1605 exposure.

Key words: Methylparathion (M1605); Monoclonal antibody (McAb); Immunoassay

甲基对硫磷 (M1605) 是一种被广泛应用的有机磷杀虫剂, 既往检测多用气相色谱法。此法仪器昂贵, 样品提取费时, 且需要专门人员操作, 不利于快速检测和技术普及^[1], 为探索其接触生物标志物, 急需建立一种简便、快速、灵敏、特异的分析方法。单克隆抗体 (McAb) 的问世及其在农药免疫分析中的应用, 使上述要求成为可能。本课题组在制备了 M1605 人工抗原和特异性 McAb 的基础上^[2], 建立了 M1605 的 ELISA 分析方法, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

M1605-BSA 人工抗原^[2]和用 M1605-TTH 人工抗原制成的 M1605 单克隆抗体为本课题组研制; M1605 购自市售农药, 本课题组纯化, 纯度在 98% 以上; M1605 标准品购自国家标准物质研究中心。牛血清白蛋白 (BSA) 和邻苯二胺 (OPD) 均为 Sigma 产品, 国内分装。HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体购自北京中山生物技术有限公司。其他化学试剂均为国产, 分析纯。96 孔酶标板为 Nunc 公司产品, 550 型酶标仪及 710 型洗板机均为美国 Bio-Rad 公司产品。

ELISA 用主要溶液: (1) 包被缓冲液为 0.85 mol/L, pH 9.6 的碳酸盐缓冲液; (2) 洗涤缓冲液为 pH 7.4 的磷酸缓冲液 (PBS); (3) 包被液: 100 ml 洗涤缓冲液中加入 1 g BSA; (4) 抗体稀释液: 100 ml 洗涤缓冲液中加入 0.1 g BSA; (5) 底物缓冲液为 pH 5.0 的磷酸-柠檬酸缓冲液; (6) 邻苯二胺 (OPD) 底

收稿日期: 2000-07-17; 修回日期: 2001-06-21

基金项目: “九五” 国家攻关课题基金资助 (96-906-04-11)

作者简介: 王刚焱 (1965-), 男, 山东东明县人, 博士, 副研究员, 从事职业医学研究。

物使用液: OPD 5 mg, 底物缓冲液 10 ml, 3% H₂O₂ 0.5 ml; (7) 终止液: 2 mol/L H₂SO₄。

1.2 研究对象

某农药厂 M1605 合成车间和包装车间工人 72 名, 检测前 1 天为白班, 无肝脏及肾脏等疾病史。BALB/c 纯种小鼠购自中国医学科学院动物研究所, 鼠龄 8 周, 体质量 (20±2) g。

1.3 实验方法³⁻⁷

1.3.1 间接 ELISA 法最佳组合条件的确定

将包被抗原稀释成 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 μg/ml 的 M1605-BSA 包被酶标板, McAb 进行倍比稀释 1:1×10⁵~1:16×10⁵ 后加样, 间接 ELISA 法测定 A 值, 选定最佳条件。

1.3.2 M1605 测定间接竞争抑制 ELISA 法的建立

本研究建立了间接竞争抑制 ELISA 法, 其基本方法如下: (1) 包被抗原: 用包被液将 M1605-BSA 稀释为 4 μg/ml, 向酶标板每孔加 100 μl, 4 °C 过夜。然后弃去孔内的液体, 用洗涤缓冲液洗涤 3 次, 每次 3 分钟 (简称洗涤), 拍干。(2) 包埋: 每孔中加包埋液 200 μl, 37 °C 水浴 1.5 小时, 洗涤, 拍干。(3) 加样: 不同浓度的 M1605 标准液或样品与 M1605 McAb 的混合液 (该液为 M1605 标准液或样品与 M1605 McAb 以 1:1 的比例混合, 37 °C 水浴 0.5 小时后备用), 每孔 100 μl, 37 °C 水浴 1 小时, 洗涤, 拍干。(4) 加酶标第二抗体: 每孔加入 1:4 000 酶标二抗体 100 μl, 37 °C 水浴 1 小时, 洗涤, 拍干。(5) 加底物液: 每孔加新配制的底物使用液 100 μl, 37 °C 水浴 15 分钟。(6) 终止反应: 每孔加终止液 50 μl。(7) 测定: 将酶标板放入酶标仪, 测定波长 490 nm 的 A 值。(8) 计算结果: A=A_样-A_空 (A_样 为血清或标准液双孔 A_{490 nm} 均值, A_空 为空白双孔 A_{490 nm} 均值)。

以标准品浓度为横坐标, 其对应的 A_{490 nm} 均值为纵坐标, 绘制标准曲线, 然后在标准曲线上查到样品的浓度, 求出其量。

将 M1605 标准液稀释成不同质量浓度 (1, 5, 10, 50, 100, 500, 1 000, 5 000 ng/ml), M1605 McAb 稀释至 1:2×10⁵, 用上述间接竞争抑制 ELISA 法检测, 即可得到标准抑制曲线和检测范围。

1.3.3 精密度的测定

取 3 个不同质量浓度的 M1605 样品 (10, 50, 100 ng/ml) 分别在同一块酶标板上各平行测定 8 孔, 算得组内变异系数。另在 4 个不同酶标板上各测 4 次, 算出组间变异系数。

1.3.4 回收率的测定

小牛血清中加入一定量的 M1605 标准液, 使其质量浓度分别为 10, 50, 100 ng/ml, 然后用间接竞争抑制 ELISA 法对其进行检测。

1.3.5 ELISA 法检测染毒小鼠血清中 M1605 含量

将 24 只 BALB/c 小鼠随机分成 4 组, 每组 6 只, 腹腔注射染毒, 染毒剂量分别为 100, 50 μg/kg, 于染毒后 0.5, 6 和 24 h 分别采血, 分离血清, 按建立的上述 ELISA 法测定血清中 M1605 的含量。

1.3.6 ELISA 法检测接触与不接触 M1605 工人血清中 M1605 的含量

ELISA 分析法分别测定上述研究对象班前和包装车间工人班中血清 M1605 含量。班前血是指早晨上班前空腹抽血, 分离血清; 班中血是指工人作业 3.5h 后, 于上午 11:30 分别抽取其静脉血, 然后分离血清, 进行检测。

2 实验结果

2.1 包被抗原和 McAb 最佳组合条件的确定

表 1 不同抗原包被浓度和不同 McAb 稀释浓度的 A 值

包被浓度 (μg/ml)	单克隆抗体稀释浓度 (×10 ⁴)				
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
8.0	2.871	1.649	1.002	0.732	0.458
4.0	2.322	1.232	0.912	0.501	0.329
2.0	0.797	0.445	0.399	0.330	0.225
1.0	0.226	0.171	0.179	0.125	0.109

矩阵法测定不同 M1605-BSA 包被浓度和 M1605 McAb 滴度的间接竞争抑制 ELISA 测定结果 (A 值) 见表 1。结果表明, 包被质量浓度为 4.0~8.0 μg/ml 时, McAb 相同稀释浓度 A 值差别不显著。而酶标仪测定 A 值的敏感范围在 1.00 左右, 为了既保证测定结果的灵敏可靠, 又减少抗原的用量, 实验应选择的最适抗原包被量为 4.0 μg/ml, 最佳抗体稀释度为 1:20 000。

2.2 间接竞争抑制性 ELISA 法的检测范围和标准抑制曲线

将 M1605 配成不同质量浓度 (1, 5, 10, 50, 100, 500, 1 000, 5 000 ng/ml) 后, 间接竞争抑制 ELISA 法测得其抑制率, 绘制出标准抑制曲线 (见图 1)。图 1 显示该方法的对数线性范围为 5~500 ng/ml, 最低检出浓度为 5 ng/ml。

2.3 间接竞争抑制性 ELISA 法的精密度测定

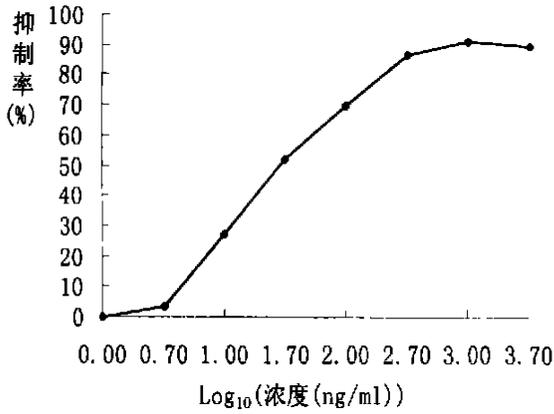


图 1 甲基对硫磷单克隆抗体标准抑制曲线

3 种不同质量浓度的 M1605 (10, 50, 100 ng/ml) 在同一板上分别做 8 个平行样, 其检测结果见表 2, 表 2 看出该方法组内变异系数为 6.7%~11.5%。

表 2 3 个样品组内变异系数

样品 (浓度)	A _{490nm}				均数±标准差	变异系数 (%)
10	0.918	1.020	0.828	1.022	0.936±0.085	9.1
	0.967	0.809	1.042	0.880		
50	0.633	0.408	0.561	0.598	0.561±0.065	11.5
	0.556	0.613	0.538	0.580		
100	0.415	0.350	0.401	0.344	0.382±0.026	6.7
	0.377	0.365	0.394	0.412		

3 种质量浓度的 M1605 (10, 50, 100 ng/ml) 在 4 块不同板上各做 4 个平行样, 其检测结果见表 3, 从表 3 可见该方法组间变异系数为 7.7%~14.6%。

表 3 3 个样品组间变异系数

样品 (浓度)	A _{490nm}				均数±标准差	变异系数 (%)
10	0.913	1.022	0.832	1.033	0.937±0.072	7.7
	0.914	0.921	0.868	0.986		
	0.905	0.908	0.847	0.954		
	0.898	0.904	1.122	0.965		
50	0.620	0.417	0.591	0.615	0.552±0.068	12.3
	0.500	0.623	0.514	0.542		
	0.495	0.480	0.526	0.518		
	0.676	0.653	0.543	0.524		
100	0.373	0.344	0.372	0.348	0.376±0.055	14.6
	0.389	0.328	0.408	0.313		
	0.375	0.322	0.391	0.344		
	0.365	0.431	0.365	0.553		

2. 4 间接竞争抑制性 ELISA 法的回收率测定

往小牛血清中加入一定量的 M1605 标准液, 使

其质量浓度分别为 10, 50, 100 ng/ml, 然后用间接竞争抑制 ELISA 法进行检测, 结果见表 4。表 4 显示其回收率为 82.3%~117.0%, 平均为 96.2%。

表 4 小牛血清的加标检测结果

配制浓度 (ng/ml)	实际检测浓度 (ng/ml)	回收率 (%)
10	11.7	117.0
50	44.6	89.2
100	82.3	82.3

2. 5 ELISA 法检测染毒小鼠血清中 M1605 含量

间接竞争抑制 ELISA 法检测 M1605 染毒小鼠血清中毒物含量, 结果见表 5。结果表明, M1605 染毒 0.5 h, 全部小鼠血清中均能检出该毒物, 染毒 6 h 后, 几乎全部小鼠血清中均还能检测到毒物, 而染毒 24 h 后, 绝大多数小鼠用该方法检测不到血清内毒物, 且毒物检出量与染毒剂量和时间具有一定的相关性。

表 5 不同染毒剂量和时间小鼠血清中 M1605 含量

染毒剂量 (mg/kg)	检测时间 (h)	动物数 (只)	检出数 (只)	含量范围 (ng/ml)	$\bar{x} \pm s$ (ng/ml)
0	0.5	8	0	0	0
1	0.5	8	8	40~115	64.95±9.68
		8	7	25~40	32.11±2.12
	24	8	1	8	8
2	0.5	8	8	55~225	94.73±24.43
		8	8	40~135	61.63±11.18
	24	8	2	8~16	12

2. 6 M1605 作业工人血清中毒物含量分析结果

经 t 检验, M1605 作业工人班前和班中 AChE 活力 ($\mu\text{mol/ml}$) 均显著低于对照组 (AChE 活力分别为: 18.5±5.7, 17.8±6.2, 21.4±4.6, $P < 0.05$), 而作业工人班前与班中 AChE 活力差异无显著性 ($P > 0.05$)。未接触 M1605 者血清中未检出 M1605, M1605 作业工人班前和班中血清中 M1605 含量检测结果见表 6。72 位作业工人班前仅有 7 位血清中检测到 M1605, 占 9.7%, 而 34 位接触者班中有 11 位检测结果阳性, 检出率达 32.4%。进一步分析包装车间班

表 6 M1605 作业工人班前和班中血清中毒物含量检测

检测时间	工种	受检人数 (名)	检出人数 (名)	含量范围 (ng/ml)	$\bar{x} \pm s$ (ng/ml)
班前	合成, 包装	72	7	7~42	14.00±12.51

中检测结果时,发现各工种中密切接触者(盖瓶盖,套标签,套盖膜,质检,补位,维修,清洁)22人,检出10人,非密切接触者(装箱及打包,上瓶及办公室)12人,仅检出1人阳性。

3 讨论

免疫分析方法包括放射免疫分析(RIA)、酶免疫分析(EIA)、荧光免疫分析(FIA)和发光免疫测定(LIA)等,都不同程度地在农药免疫分析中得到应用^[8~11],其基本原理相似,但由于RIA的放射性污染、FIA和LIA对设备的较高要求,使其普及受到限制,EIA是指用酶标记抗体、抗抗体或抗原进行抗原抗体反应,在农药免疫分析中应用较广泛,酶联免疫吸附分析(ELISA)是最常用的检测方法^[7,9]。本研究应用本课题组研制的抗M1605 McAb建立了间接竞争抑制ELISA法检测血中M1605,检测范围5~500 ng/ml,最低检测质量浓度5 ng/ml,组内变异系数最大为11.5%,组间变异系数最大为14.6%,回收率为82.3%~117.0%,平均为96.2%。并用该方法对M1605染毒小鼠和接触工人血清中毒物含量进行了检测,初步应用的结果令人满意。

M1605在体内代谢或生物转化很活跃且较快,在体内无长期蓄积,从血清中清除的半减期为11小时,一般很难用常用检测方法检测到^[12~14]。本研究发现染毒0.5h几乎全部小鼠血清内都能检测到毒物,而小鼠染毒24h后,高剂量组8只小鼠中仅2只血清中检测到M1605,低剂量染毒组只有1只可检测到。M1605作业工人脱离接触十几小时后,72名工人(班前)仅有7人检测阳性,而在工作的接触期间(班中),34名作业工人有11人血清中M1605检测阳性,且后者均值比前者明显增高,并与工种有关。说明该方法能较好地反映不同接触时间和接触浓度时的接触内剂量,可考虑作为M1605的接触生物标志物。

红细胞或全血AChE活力是反映有机磷农药接触水平最可靠、应用最广泛的生物学指征^[15],持续接触有机磷农药会使其失活,失活的AChE的活力仅随红细胞的再生而恢复。因此,AChE活力的高低有时与机体有机磷的接触水平及其变化不平行。本文结果显示,班中工人血清中M1605的阳性率高于班前,但全血AChE变化无显著性。提示ELISA检测血清中M1605可能比全血乙酰胆碱酯酶更能反映机体对M1605的接触水平。

M1605 McAb的成功制备和免疫分析方法的建立,

使简便、快速、特异的检测M1605成为可能,今后研制成试剂盒,将更有利于该毒物的危险度评价,接触工人的健康监护和中毒的诊断和治疗。预计该试剂盒不仅可用于检测接触者血、呕吐物和洗胃液中的M1605,还可用于检测食品和蔬菜中污染的M1605,将具有一定的实用价值和应用前景,为此还需要做大量工作。

参考文献:

- [1] 王刚垛,何凤生,荣康泰. 农药免疫分析方法进展[J]. 国外医学卫生学分册, 1998, 25(5): 301-304.
- [2] 王刚垛,马兆扬,鱼涛,等. 甲基对硫磷人工抗原的合成及鉴定[J]. 卫生研究, 2000, 29(2): 69-70.
- [3] Marco MP, Gee SJ, Cheng HM, et al. Development of an enzyme linked immunosorbent assay for carbaryl [J]. J Agric Food Chem, 1993, 41: 423.
- [4] Abad A, Montoya A. Production of monoclonal antibodies for carbaryl from a hapten preserving the carbamate group [J]. J Agric Food Chem, 1994, 42(8): 1818-1823.
- [5] Garrett SD, Appleford D, Wyatt GM, et al. Production of a recombinant anti-parathion antibody (scFv); stability in methanolic food extracts and comparison to an anti-parathion monoclonal antibody [J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 4183-4189.
- [6] Wittmann C, Hock B. Application and performance characteristics of a novel ELISA for the quantitative analysis of the atrazine metabolite deethylatrazine [J]. J Agric Food Chem, 1993, 41: 1795-1799.
- [7] Selisker MY, Herzog DP, Erber RD, et al. Determination of paraquat in fruits and vegetables by a magnetic particle based Enzyme-linked Immunosorbent Assay [J]. J Agric Food Chem, 1995, 43: 544-547.
- [8] Bowles MR, Eyles DW, Hampson EC, et al. Quantitation of paraquat in biological samples by radioimmunoassay using a monoclonal antibody [J]. Fundam Appl Toxicol, 1992, 19: 375-379.
- [9] Schlaeppli JM, Moser H, Ramsteiner K. Determination of metolachlor by competitive enzyme immunoassay using a specific monoclonal antibody [J]. J Agric Food Chem, 1991, 39: 1533-1536.
- [10] Sanchez FG, Navas A, Lovillo J. Phase-modulation fluorescence life time immunoassay of dichlorprop [J]. Anal Biochem, 1993, 214: 359-365.
- [11] Diamandis EP, Chritopoulos TK. Europium chelate labels in time-resolved fluorescence immunoassays and DNA hybridization assays [J]. Anal Chem, 1990, 62: 1149A-1157A.
- [12] 王莹,顾祖维,张胜年,等. 现代职业医学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1996. 476-489.
- [13] Chang MJ, Chen YC, Yang HJ. Comparative evaluation on the biological monitoring of exposure to parathion and its methyl analog [J]. Arch Environ Contam Toxicol, 1997, 32(4): 422-425.
- [14] Abu-Qare AW, Abdel-Rahman AA, Kishk AM, et al. Placental transfer and pharmacokinetics of a single dermal dose of [14C] methyl parathion in rats [J]. Toxicol Sci, 2000, 53(1): 5-12.
- [15] Maroni M, et al. Toxicology, 2000, 143: 9-37.