

胶体金免疫层析试纸条快速检测 水和玉米中阿特拉津的残留

生威, 那宇, 张琳, 刘冰, 王硕

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 教育部食品营养与安全重点实验室, 天津 300457)

摘要: 本文以胶体金作为抗体标记物, 建立了一种检测阿特拉津残留的免疫层析试纸条快速检测方法。该方法的检出限为 2 ng/mL, 10 min 内可以得到检测结果。本文以自来水和玉米作为样品进行了添加回收实验, 水样不需要任何前处理直接检测, 水样的检出限为 2 ng/mL; 玉米样品经简单前处理后检测, 玉米样品的检出限为 40 ng/g, 且该方法的检测结果与间接竞争 ELISA 方法的结果一致。该方法具有成本低、操作简单、灵敏度高、检测快速, 结果易于判定等优点, 适用于大量样品的现场筛选。

关键词: 阿特拉津; 胶体金; 免疫层析试纸条; 水; 玉米

文章编号: 1673-9078(2012)3-360-363

Rapid Detection of Atrazine Residue in Water and Corn by Colloidal Gold-based Immunochromatographic Strip

SHENG Wei, NA Yu, ZHANG Lin, LIU Bing, WANG Shuo

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education of China, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: An immunochromatographic strip assay using colloidal gold-labeled antibody was developed. The visual limit of detection (LOD) of the assay for atrazine in PBS was 2 ng/mL. And the results could be obtained within 10 min. Spiked tap water sample was analyzed directly by the test strip without any pretreatment and the LOD was 2 ng/mL. Meanwhile, spiked corn sample was analyzed after simple pretreatment and the LOD was 40 ng/g. The results obtained by the immunochromatographic strip assay correlated well with those determine by indirect competitive ELISA. Because of its low cost, simple operation, high specificity, fast detection and easy-to-judgment results, the strip could serve as an on-site screening of a large number of samples.

Key words: atrazine; colloidal gold; immunochromatographic strip; water; corn

阿特拉津是一种抑制光合作用的持久性广谱除草剂, 主要用于玉米、高粱、甘蔗、茶园和果园除草^[1], 是世界上应用最广泛的除草剂之一。阿特拉津使用量大, 残留期长, 不断有阿特拉津污染事件的报道^[2,3]。已有研究证明阿特拉津具有内分泌干扰作用^[4,5]和潜在的致癌作用^[6,7], 目前已被列为可疑致癌物质。美国、加拿大相关部门规定饮用水中阿特拉津的最大允许残留限量 (MRL) 分别为 3 ng/mL 和 5 ng/mL; 我国对生活自来水及地表水中阿特拉津规定的 MRL 为 2 ng/mL 和 3 ng/mL, 对玉米中阿特拉津规定的 MRL 为 0.05 mg/kg。阿特拉津常用的检测方法包括: 气相色谱法 (GC)^[8]、高效液相色谱法 (HPLC)^[9]、液相色谱质谱联用技术 (HPLC-MS)^[10]、气相色谱质谱联用

技术 (GC-MS)^[11]和免疫分析法 (IA)^[12,13]等。但 these 方法操作繁琐、费时, 不适于快速、简便地进行大批量样品的现场筛选。本研究基于胶体金免疫层析技术, 研制出检测自来水和玉米中阿特拉津残留的胶体金免疫层析试纸条。目前国内尚未见应用该技术检测阿特拉津残留的相关报道。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂及溶液

柠檬酸三钠、氯金酸 ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、阿特拉津、扑灭津、敌草净、特丁通、氰草津、特丁津、西草净、扑草净、莠灭净、特丁津、扑灭通、西玛津、牛血清白蛋白 (BSA)、聚乙二醇 (PEG20000) 和羊抗兔二抗均购于美国 Sigma 公司; 阿特拉津包被抗原与兔抗阿特拉津多克隆抗体由本实验室制备; 其它试剂均为

收稿日期: 2011-12-22

作者简介: 生威 (1980-), 女, 博士, 研究方向为食品安全检测

通讯作者: 王硕 (1969-), 教授, 博导, 研究方向为食品安全和免疫学检测

国产分析纯试剂。

金标抗体稀释液：含有 5%蔗糖、5% BSA、1%吐温-20 和 0.05%叠氮钠的 0.1 M 的 Tris-HCl 溶液；包被液：pH 9.6 碳酸盐缓冲溶液；封闭液：0.5%乳粉/PBS；洗涤液：PBST（含 0.05% Tween 20 的 PBS）；显色底物溶液：TMB/H₂O₂；终止液：1.25 mol/L 硫酸。

1.1.2 层析试纸条材料

金标抗体结合垫（SB06 玻璃纤维膜）、样品垫、吸水垫（CH27 吸水纸）和聚氯乙烯（PVC）背板均购自上海金标生物科技公司；硝酸纤维素膜（180s）购自美国 Millipore 公司。

1.1.3 主要仪器

酶标仪购自美国 Thermo 公司；移液器购自法国 GILSON 公司；二维平面划膜仪和全自动斩切机购自上海金标生物科技公司；Milli-Q 超纯水系统购自美国 Millipore 公司；LTI-700 恒温恒湿培养箱购自日本 EYELA；CARY 50 Bio 紫外/可见分光光度计购自美国 Varian 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 胶体金的制备

取 1 mL 1%的 HAuCl₄ 水溶液加入到 100 mL 双蒸水中，混匀后加热至沸腾，在持续剧烈搅拌的条件下，迅速加入 2 mL 1%的柠檬酸三钠水溶液，待溶液颜色变为酒红色并不再变化时，继续煮沸 15 min，然后冷却至室温，最后用双蒸水定容到原体积，4 °C 保存备用。

1.2.2 胶体金标记抗体的制备

用 0.1 M K₂CO₃ 将 10 mL 胶体金的 pH 调至 8~9，搅拌条件下将 250 μL 浓度为 1 mg/mL 的抗体逐滴连续地加入胶体金溶液中，混匀后室温静置 1 h，然后向其中先后加入 200 μL 质量浓度为 20% BSA 和 100 μL 质量浓度为 20% PEG 20000 以封闭胶体金颗粒表面残留的基团，混匀后室温静置 1 h。最后将以上溶液分装到 1.5 mL 的离心管中，每管 1 mL，于 10000 r/min 4 °C 条件下离心 30 min，弃去上清，沉淀用金标稀释液重悬至 1 mL，4 °C 保存备用。

1.2.3 试纸条的组装

用二维平面划膜仪将包被抗原与羊抗兔二抗以 1 μL/cm 的量分别固定在 NC 膜上，作为检测线和质控线，干燥后封闭备用；用金标抗体稀释液将金标抗体稀释一定倍数以后喷涂在结合垫上，37 °C 干燥过夜。在 PVC 背板上依次粘贴硝酸纤维素膜（NC 膜）、金标抗体结合垫、样品垫和吸水垫，然后用全自动斩切机切成宽度为 3.7 mm 的试纸条，密封干燥保存。

1.2.4 免疫层析试纸条检测原理及检出限的确定

免疫层析试纸条是基于一种竞争原理^[14,15]：样品中的阿特拉津和 NC 膜上固定的包被抗原竞争结合金标抗体。当待测样品滴加到样品垫上以后，样品液通过毛细作用从下往上移动，当样品液经过结合有金标抗体的结合垫时，金标抗体就会溶解到样品液中并和样品一起在 NC 膜上向上层析，当经过固定了包被抗原的检测线（T 线）和固定了羊抗兔二抗的质控线（C 线）时，若样品中有阿特拉津，则样品中阿特拉津就会与检测线上的包被抗原一起竞争结合金标抗体，阿特拉津的浓度越高，与包被抗原结合的金标抗体就越少，则检测线条带颜色越浅，因此，检测线的条带颜色强度与样品中阿特拉津的含量成反比。

本文中试纸条的检出限定义为：使试纸条检测线（T 线）的条带颜色与质控线（C 线）相比产生明显区别的阿特拉津的最小浓度。同时测定 11 种结构类似的三嗪类农药是否干扰检测：扑草津、敌草净、特丁通、氰草津、特丁津、西草净、扑草净、莠灭净、特丁津、扑灭通和西玛津。

1.2.5 样品检测

自来水采自实验室，经高效液相色谱法（HPLC）验证为阴性样，添加一定浓度的阿特拉津（0、1、2、5 ng/mL）后直接用于试纸条检测。

玉米粉购自某超市，经 HPLC 验证为阴性样，具体前处理方法如下：准确称取 1 g 的玉米粉于 50 mL 的离心管中，分别添加一定浓度的阿特拉津（0、20、40、100 ng/g），向其中加入 6 mL 甲醇，于 2500 r/min 的振荡器上混合 5 min，然后 5000 r/min 离心 10 min，上清液氮气吹干后复溶于 1 mL PBS，再用 PBS 稀释 20 倍待测。

1.2.6 稳定性实验

将制备好的试纸条置于室温放置的干燥器中，分别在第二、四、六、八周取出测定，每次 3 组，观察条带的颜色以及试纸条的灵敏度的变化。

2 结果与讨论

2.1 胶体金质量的鉴定

本实验制备的胶体金溶液为清亮透明的酒红色溶液，液体表面没有漂浮物，使用紫外/可见分光光度仪扫描最大吸收波长来估计金颗粒的粒径，图 1 为胶体金溶液在 400~600 nm 扫描图谱，可以看出在 520 nm 处有单一的吸收峰，初步确定胶体金的粒径约为 20 nm，峰宽窄且波形光滑，说明胶体金粒径均一。

2.2 方法工作条件的优化

羊抗兔二抗 1:200 稀释固定在 NC 膜上，将包被抗原分别按 0.5 mg/mL、1.0 mg/mL 和 2.0 mg/mL 的浓

度包被在 NC 膜上, 将金标抗体用金标稀释液按 1:10、1:15 和 1:20 稀释喷涂在结合释放垫上, 观察试纸条检测线 (T 线) 的显色情况及方法的灵敏度, 优化结果见表 1。

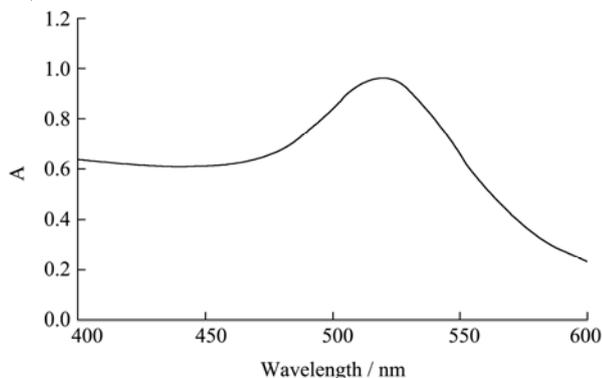


图 1 胶体金的 400~600 nm 的扫描图谱

Fig.1 UV-Vis Spectrum (400~600nm) of colloidal golds

表 1 包被抗原浓度和金标抗体稀释倍数的优化结果

Table 1 Optimization of the concentration of coating antigen and dilution level of the gold-labeled antibodies

金标抗体稀释倍数	包被抗原浓度/(mg/mL)		
	0.5	1.0	2.0
1:10	+++	+++	+++
1:15	++	+++	+++
1:20	+	++	++

注: + 表示 T 线颜色略浅, 肉眼可见, 但不便观察; ++ 表示 T 线颜色较深; +++ 表示 T 线颜色很深, 但灵敏度不好

由表 1 可以看出, 其中有三个标记“++”的组合 T

线条带颜色适中, 又分别检测了一系列浓度的阿特拉津标准溶液, 结果表明当包被原浓度为 0.5 mg/mL, 金标抗体 1:15 稀释时, 方法灵敏度最好。为便于观察, 优化二抗稀释倍数使纸条上 C 线和 T 线的条带颜色尽量一致, 最终确定羊抗兔二抗的稀释倍数为 1:300。

2.3 方法的检出限及特异性

用制备好的胶体金试纸条检测一系列浓度 (0、1、2、5、10 ng/mL) 的阿特拉津标准溶液, 结果见图 2。可以看出, 随着阿特拉津浓度的增大, T 线颜色变浅, 直至消失。当阿特拉津的浓度为 2 ng/mL 时, T 线条带颜色与 C 线有明显区别; 当阿特拉津的浓度为 5 ng/mL, T 线条带完全消失。本文检出限定义为使试纸条 T 线的条带颜色与 C 线相比产生明显区别的阿特拉津的最小浓度, 即为 2 ng/mL。同时用该试纸条检测了其他 11 种结构类似的三嗪类除草剂, 结果表明除了与扑灭津有一定的交叉以外, 另外 10 种除草剂均不会干扰检测 (浓度为 200 ng/mL 时 T 线条带仍然清晰可见)。



图 2 试纸条检测结果

Fig.2 Detection of atrazine in 0.01M PBS by test strip

表 2 ELISA 与试纸条检测样品添加回收实验结果对比

Table 2 Comparison of ELISA and test strip in analysis of samples spiked by atrazine

样品	添加浓度 / [(ng/mL)/(ng/g)]	间接竞争 ELISA 的检测结果 / [(ng/mL)/(ng/g)]	试纸条的检测结果
自来水 (n=3)	0	nd ^a	--- ^b
	1	0.97±0.04	---
	2	2.12±0.11	+++ ^c
	5	5.25±0.21	+++
玉米 (n=3)	0	nd	---
	20	15.2±1.18	---
	40	35.2±2.25	+++
	100	92.7±5.84	+++

注: a. 未检测出, 阿特拉津的含量低于 ELISA 方法的检出限; b. 阴性结果; c. 阳性结果。

2.4 样品检测

根据 2.3 检出限的定义可以得出结论: 当试纸条上两个条带颜色接近时, 说明水样 (玉米) 中阿特拉津的浓度低于 2 ng/mL (40 ng/g), 定义为阴性结果 (-); 当试纸条上 T 线条带颜色与 C 线相比有明显区别时, 说明水样 (玉米) 中阿特拉津的浓度高于或接近 2

ng/mL (40 ng/g), 定义为阳结果 (+)。按照 1.2.5 所述方法处理样品以后直接用于试纸条检测, 加标水样和玉米样品提取液稀释一定倍数以后用于间接竞争 ELISA 检测, ELISA 方法的 IC₅₀=0.4 ng/mL, 线性范围为 0.064~8 ng/mL, 两种方法的检测结果见表 2。可以看出, 该方法对自来水的检出限为 2 ng/mL, 对玉

米样品的检出限为 40 ng/g, 并且试纸条的检测方法与 ELISA 方法的结果一致, 说明该方法准确可靠。

2.5 稳定性实验

每两周从干燥器中取出 9 个试纸条, 分为 3 组, 每组检测三个浓度 (0、2 和 5 ng/mL) 的阿特拉津标准溶液。结果表明: 在室温保存 8 周的试纸条, 条带颜色和试纸条的检出限与新制备的试纸条都没有明显变化, 说明室温干燥条件下, 该试纸条至少可以保存 2 个月。

3 结论

本研究成功研制出了阿特拉津快速检测试纸条, 该试纸条可用于水样和玉米样品的检测, 其方法检出限为 2 ng/mL, 自来水样品实际检出限为 2 ng/mL, 能够满足我国、美国及加拿大等国对阿特拉津饮用水最高残留限量的要求, 玉米样品实际检出限为 40 ng/g, 能满足我国对玉米中阿特拉津允许残留限量的要求。该方法检测快速, 10 min 内即可判读结果, 而且具有成本低、操作简单、灵敏度高、准确性好等优点, 适合于大量样品的现场快速检测。

参考文献

- [1] 王焕民, 张子明. 新编农药手册 [M]. 北京: 农业出版社, 1989
- [2] Martin M, Hagege A. Use of synergistic extraction for the study of atrazine/metal interactions [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1998, 373(2): 161-165
- [3] 杨敏娜, 周芳, 孙成, 等. 长江江苏段有毒有机污染物的残留特征及来源分析[J]. *环境化学*, 2006, 25(3): 375-376
- [4] Hayes TB, Collins A, Lee M, et al. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(4): 5476-5480
- [5] Podda MV, Deriu F, Solinas A, et al. Effect of atrazine administration on spontaneous and evoked cerebellar activity in rat [J]. *Pharmacological Research*, 1997, 36(3): 199-202
- [6] Nalina S, Elizabeth D. A review of epidemiologic studies of triazine herbicides and cancer [J]. *Critical Review in Toxicology*, 1997, 27(6): 599-613
- [7] Vanl JA, Walnter TD, Abernathy T. Associations between stomach cancer incidence and drinking water contamination with atrazine and nitrate in Ontario (Canada) agroecosystems, 1987-1991 [J]. *International Journal of Epidemiology*, 1999, 28(5): 836-840
- [8] 岳有来, 胡燕峰, 李晓红. 气相色谱法测定水中的阿特拉津 [J]. *中国环境监测*, 2005, 21(6): 42-43
- [9] 谢勇坚, 黎小敏. 固相萃取-高效液相色谱法测定水中阿特拉津 [J]. *西南给排水*, 2009, 31(4): 43-45
- [10] Bichon E, Dupuis M, Bizec BL, et al. LC-ESI-MS/MS determination of phenylurea and triazine herbicides and their dealkylated degradation products in oysters [J]. *Journal of Chromatography B*, 2006, 838(4): 96-106
- [11] 李惠玲, 胡燕峰, 徐建. 水中痕量阿特拉津的气相色谱-质谱检测方法 [J]. *河北建筑工程学院学报*, 2007, 25(3): 57-58
- [12] Kaur J, Boro RC, Wangoo N, et al. Direct hapten coated immunoassay format for the detection of atrazine and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 607(1): 92-99
- [13] 邓安平, Franek M. 酶联免疫吸附分析法测定水样中的阿特拉津 [J]. *分析化学研究报告*, 1998, 26(1): 29-33
- [14] 吴广红, 何良兴, 张少恩. 胶体金免疫层析法快速检测磺胺嘧啶残留 [J]. *现代食品科技*, 2009, 25(5): 577-579
- [15] 韩静, 刘恩梅, 王帅, 等. 胶体金免疫层析法检测食品中的磺胺类药物残留 [J]. *现代食品科技*, 2011, 27(5): 603-606