

除草剂扑草净胶体金免疫层析检测试纸条的研制

李伶俐, 张琳, 那宇, 生威, 王硕

(天津科技大学教育部食品营养与安全重点实验室, 天津 300457)

摘要: 制备了扑草净胶体金免疫层析检测试纸条, 建立了水样中扑草净的快速检测方法。采用柠檬酸三钠还原氯金酸法制备胶体金, 对胶体金免疫层析方法的工作条件(NC膜的封闭条件、金标垫的处理方法)进行优化。最终建立的方法检出限为5 ng/mL, 5 min内可以通过目测进行结果判断。河水样品不需要任何处理可以直接进行检测, 检出限为5 ng/mL。本研究建立的快速免疫检测方法适用于水中扑草净残留的现场检测。

关键词: 扑草净; 胶体金; 免疫层析; 水样; 快速检测

文章编号: 1673-9078(2012)4-424-426

Development of a Colloidal Gold Immunochromatographic Strip for Rapid Detection of Herbicide Prometryn

LI Ling-ling, ZHANG Lin, NA Yu, SHENG Wei, WANG Shuo

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

Abstract: The colloidal gold immunochromatographic assay (CGIA) was applied in rapid detection of herbicide prometryn in water samples. Colloidal gold particles were prepared via trisodium citrate method. The CGIA conditions were optimized for high sensitivity. The detection limit of CGIA was 5 ng/mL and the detection process could be completed within 5 min. The river water samples were detected directly by the strip and the limit of detection was 5 ng/mL. The developed immunoassay in this study was a suitable tool for rapid screening residue of prometryn in water samples.

Key words: prometryn; colloidal gold; immunochromatographic assay; water samples; rapid detection

扑草净(prometryn), 化学名称为2-甲硫基-4,6-二(异丙胺基)-1,3,5-三氮苯。它是三嗪类除草剂中最具有代表性的一种。扑草净通过抑制光合电子传递或拦截传递到氧化型辅酶II(NADP⁺)的电子, 可以抑制植物的光合作用, 进而达到除草的目的^[1,2], 主要用来防除一年生单子叶和双子叶杂草, 适用于棉花、向日葵、蚕豆、水稻和部分蔬菜地(如马铃薯、胡萝卜、芹菜、韭菜、豌豆等)^[3,4], 但这类农药结构稳定, 在中性的条件下不会发生水解、降解、生物光解。随着使用量的增加, 常常会残留到环境及农作物中, 进而给水体生物、动植物、人类健康带来危害。目前, 应用广泛、方法完善的检测分析扑草净的方法有气相色谱法^[5,6]、高效液相色谱法^[7,8]等, 但由于设备昂贵, 样品前处理复杂, 测定时间较长, 使其推广普及受到一定的限制。酶联免疫检测方法(ELISA), 灵敏度高,

收稿日期: 2011-12-28

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目(2009BADB9B03; 2009BADB9B06)

作者简介: 李伶俐(1985-), 女, 硕士, 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

特异性好, 样本前处理简单, 但由于ELISA检测时需要酶标仪等仪器并且反应需要一定的温育时间, 实现真正的现场操作有困难。胶体金免疫层析法(CGIA)由于成本低廉、快速(5 min内可以结束检测)、不需要任何仪器、操作简单, 结果判断容易等优点, 在现场快速检测方面具有广阔的应用前景^[9,10]。本研究研制了扑草净胶体金免疫层析试纸条, 建立了水样中扑草净残留快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

氯金酸(HAuCl₄·4H₂O)、扑草净标准品、牛血清白蛋白(BSA)、聚乙二醇20000、羊抗兔二抗购于Sigma公司; 扑草净多克隆抗体, 包被抗原由本实验室自制; 硝酸纤维素膜(180 s)购于美国Millipore公司; SB06、SB08玻璃纤维垫, CFSP223000吸水纸、PVC背板、双维平面划膜仪、全自动斩切机购于上海金标生物科技公司; LTI-700恒温恒湿培养箱购自日本Eyela; Milli-Q超纯水仪购于美国Millipore公司,

冷冻离心机购于德国 Eppendorf 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 胶体金的制备

采用柠檬酸三钠还原法^[11]制备胶体金:取 100 mL 超纯水,并加入 1 mL 1%的氯金酸,加热至沸腾。沸腾后在持续搅拌的同时迅速加入 1%的柠檬酸三钠水溶液 2.25 mL,待溶液颜色变为透明的红色并不再变化时,再煮沸 15 min,室温冷却,用超纯水恢复到原体积,4 °C 保存。

1.2.2 胶体金标记抗体的制备

以标记 2 mL 胶体金为例,具体标记过程如下^[12,13]:

取 2 mL 胶体金溶液于干净的试管中,加入适量 0.2 mol/L K_2CO_3 溶液,调节胶体金溶液 pH 至 7~8。然后向胶体金中加入适量抗体 (25 μ g 抗体/mL) 轻微振荡混匀,室温下静置 1 h。加入 10 μ L 10%的 PEG 20000 和 20 μ L 10%的 BSA,迅速混匀,静置 5 min。对胶体金标记的抗体采用低温超速离心法进行纯化:先将胶体金标记的抗体用 2000 r/min 低速离心 15 min,弃去沉淀;再以 10000 r/min 在 4 °C 下离心 30 min,离心后弃去上清液。用金标储存液溶解胶体金至原体积,重复上一步离心步骤,弃去上清,浓缩的金标液用储存液重悬为原体积的 1/10,4 °C 保存备用。

1.2.3 NC 膜处理条件的优化

分别将画好线的 NC 膜浸泡到三种不同封闭液中 1 h,洗涤干燥后组装成条,对比不封闭和三种封闭液条件下试纸条的显色时间、显色程度和灵敏度。

1.2.4 金标结合垫处理条件的优化

将金标结合垫分别浸泡到三种不同处理液中后烘干,再喷涂上金标抗体,干燥,组装成条,对比在三种金标结合垫处理条件下试纸条的显色时间、显色程度和灵敏度。

1.2.5 免疫层析试纸条的组装

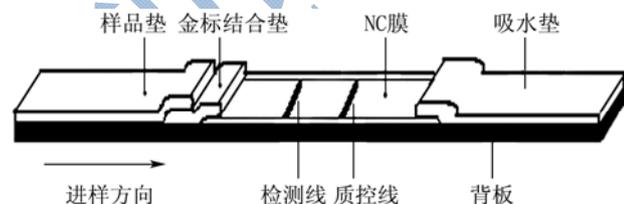


图1 胶体金免疫层析试纸条组装图

Fig.1 Assemblage of the CGIA strip

用划膜仪将包被抗原、羊抗兔二抗划在硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上,分别作为检测线和质控线,37 °C 干燥过夜。金标抗体喷涂在金标结合垫上,37 °C 真空干燥过夜。在 PVC 背板上依次粘帖硝酸纤维素膜、吸水垫、金标结合垫、样品垫 (如图 1), 然后

用切条机切成条状 (60 mm×3.7 mm), 密封干燥保存。

1.2.6 免疫层析方法检测限的确定

用 PBS 配制浓度分别为 0 ng/mL (阴性对照)、5 ng/mL、10 ng/mL 和 20 ng/mL 的扑草净标准溶液,将标准溶液分别滴加到组装好的试纸条的样品垫上。5 min 后目视判定结果。检测限定义为以能与阴性对照的试纸条的检测线有明显颜色差别的扑草净的最小浓度^[14]。

2 结果与讨论

2.1 NC 膜封闭条件的选择

为了减少非特异性吸附、降低背景颜色以及提高检测灵敏度,通常可以对 NC 膜进行封闭处理。但同时也并不是所有的封闭都能提高试纸条检测灵敏度,此外,封闭通常会降低整个检测系统的层析速度。所以,NC 膜是否需要封闭以及使用何种封闭液封闭,需要综合考虑灵敏度和检测时间。按照 1.2.3 的方法,得到不同条件下封闭结果如图 2。

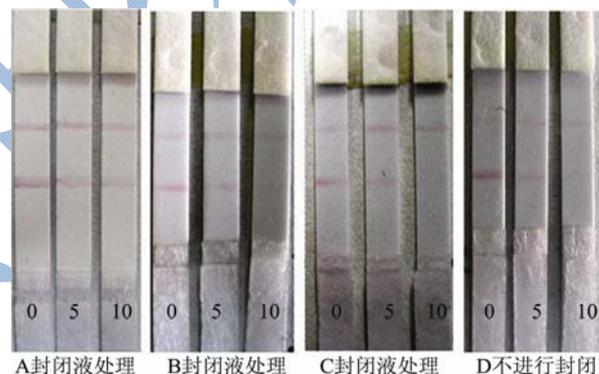


图2 不同的封闭液处理硝酸纤维素膜的结果 (ng/mL)

Fig.2 The results of the NC membrane treated with different blocked buffer

注: A 为 1% BSA/PBS 封闭液; B 为 0.5% 脱脂奶粉/PBS 封闭液; C 为 1% BSA/PBST 封闭液, D 为不封闭。

如图 2 可看出, A 封闭液处理后试纸条整体条带颜色加深,但是检测线颜色的梯度不明显,检测灵敏度低; 同样 B 封闭液处理后试纸条颜色变化不明显,检测灵敏度低; C 封闭液处理后,试纸条颜色和灵敏度跟未封闭的结果相同。但是,封闭后层析时间大约 15 min,远远长于未封闭的层析时间 (5 min)。所以,可以认为封闭并没有给实验结果带来显著的改良,最终确定不对硝酸纤维素膜进行封闭处理。

2.2 金标结合垫处理条件的选择

用不同配方的溶液对金标结合垫处理后,会对试纸条的显色程度、信号强度等造成不同的影响。本实验对金标垫用不同处理液处理,得到的结果如图 3。

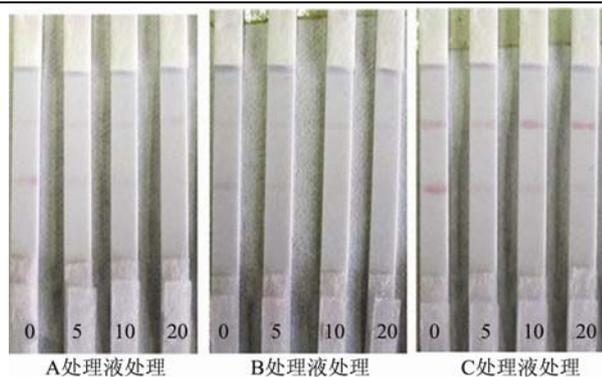


图3 不同处理液处理金标结合垫的结果 (ng/mL)

Fig.3 The results of the conjugate pad treated with different blocked buffer

注: A 为含 0.1% PEG 20000, 0.1% BSA 的 PBS 处理液; B 为含 2%蔗糖、0.1% BSA、0.05% PEG 20000 的 PBST 处理液; C 为含 10%蔗糖、5% BSA、0.01%吐温-20、0.1%叠氮钠的 PBS 处理液。

如图 3 可以看出, C 处理液处理金标垫后的试纸条相对于 A、B 处理液处理的试纸条, 整体条带颜色加深, 便于观察; 检测线颜色梯度明显, 灵敏度强, 便于检测。因此, 确定用 C 处理液作为金标垫处理液。

2.3 免疫层析方法的检测限

在优化好的层析条件下建立的扑草净免疫层析试纸条的检测结果如图 4。从左到右扑草净标准溶液的浓度依次为 0、5、10、20 ng/mL。

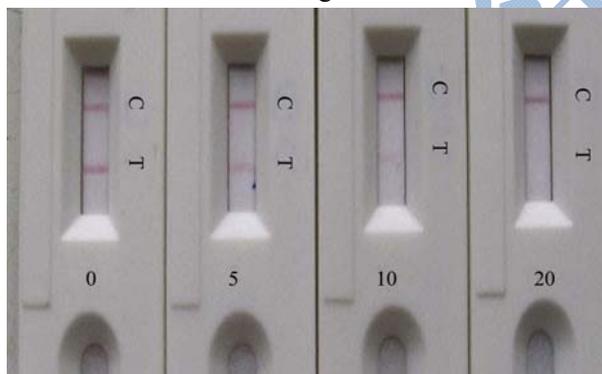


图4 扑草净试纸条检测结果 (ng/mL)

Fig.4 Results of detection of prometryn by CGIA

从图 4 可以看出, 当标准溶液浓度为 5 ng/mL 时, 与阴性对照的试纸条的检测线有明显颜色差别, 故认为扑草净快速检测试纸条的检测限为 5 ng/mL。

2.4 水样的测定

选择海河水作为检测样品, 将水样中添加扑草净标准品, 使其终浓度分别为 0、5、10、20 ng/mL。水样不需处理, 采用直接上样的方法检测, 5 min 后可以目视判断结果如图 5。

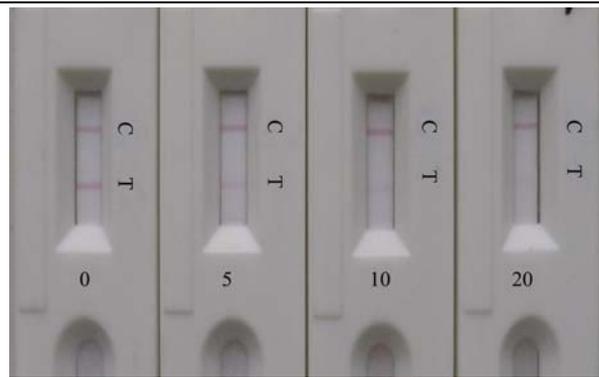


图5 海河水试纸条的检测 (ng/mL)

Fig.5 The detection of prometryn in Haihe River by CGIA

当海河水中扑草净浓度为 5 ng/mL 时, 与阴性对照的试纸条的检测线有明显颜色差别, 故认为扑草净试纸条检测海河水的检测限为 5 ng/mL。

3 结论

免疫层析试纸条检测方法属于定性半定量方法, 简便, 快速、无需借助仪器, 实际检测中只需将样品处理液用试纸条进行检测, 目测结果。本研究建立的扑草净试纸条检测方法灵敏度高、操作简单、5 min 内可以目测判定结果。河水样品无需前处理, 所用试剂均无毒、无污染, 可以作为现场快速检测扑草净残留的有效手段, 对环境中扑草净残留的监控有重要意义。

参考文献

- [1] Khan SU, Hamilton HA. Extractable and bound (nonextractable) residues of prometryn and its metabolites in an organic soil [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1980, 28(1): 126-132
- [2] Khan SU. Distribution and characteristics of bound residues of prometryn in an organic soil [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1982, 30(1): 175-179
- [3] Zhou J, Li X, Jiang Y, et al. Combined effects of bacterial-feeding nematodes and prometryne on the soil microbial activity [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 192(3): 1243-1249
- [4] Kozak J, Weber J, Sheets T. Adsorption of prometryn and metolachlor by selected soil organic matter fractions [J]. *Soil Science*, 1983, 136(2): 94
- [5] Brvar M, Okrajsek R, Kosmina P, et al. Metabolic acidosis in prometryn (triazine herbicide) self-poisoning [J]. *Clin Toxicol (Phila)*, 2008, 46(3): 270-273
- [6] Nagaraju D, Huang SD. Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid

- microextraction with gas chromatography-ion trap mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1161 (1-2): 89-97
- [7] 沈伟健,杨雯笈,赵增运.气相色谱-质谱联用法测定紫菜中扑草净的残留量[J].*分析试验室*,2008,27(2):291-292
- [8] Cheng J, Liu M, Zhang X, et al. Determination of triazine herbicides in sheep liver by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography [J]. *Analytica chimica acta*, 2007, 590(1): 34-39
- [9] 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
- [10] 王玮,张燕,刘俊伟,等.胶体金免疫渗滤法检测淡水鱼及牛乳中氯霉素残留[J].*现代食品科技*,2008,24(1):72-75
- [11] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions [J]. *Nature*, 1973, 241(105): 20-22
- [12] Hermanson GT. *Bioconjugate techniques* [M]. Academic Press, 1996
- [13] Oliver C. Conjugation of colloidal gold to proteins [J]. *methods in molecular biology*, 1999, 115: 303-307
- [14] Girotti S, Eremin S, Montoya A, et al. Development of a chemiluminescent ELISA and a colloidal gold-based LFIA for TNT detection [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396(2): 687-695