

## 对硝苯磷酯的放射免疫测定

荣康泰、徐勤惠、邵茹辛、龚雄麒 (军事医学科学院药理毒理研究所, 北京 100800)

**提要** 经有效抑制血清内酯酶以避免对硝苯磷酯分解后, 对硝苯磷酯放射免疫分析的灵敏度达  $0.20 \text{ ng}(0.72 \text{ pmol})$ , 全血样品可直接测定。抗血清的特异性强, 亲和常数  $K = 2.13 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ , 工作滴度  $1:1000$ 。1-2, 10 和  $23.5^\circ\text{C}$  时  $[^3\text{H}]$  对硝苯磷酯-抗体复合物的离解速度常数分别为  $0.00470$ ,  $0.0155$  和  $0.238 \text{ min}^{-1}$ 。

**关键词** 对硝苯磷酯; 放射免疫测定; 血清酯酶; 抗体亲和力; 抗原抗体复合物

对硝苯磷酯(paraoxon, PO)是农药对硫磷(parathion, PT)系列中最早合成的化合物, 也是有机磷化合物毒理学研究中较重要的工具。现有的 PO 测定方法, 以气液或高效色谱技术<sup>(1,2)</sup>的灵敏度高, 精密度好, 但样品需经繁杂处理, 不适于大量样品的测定。PO 的放射免疫分析(RIA)迄今未见报告。本文报告 PO 的 RIA, 灵敏度高, 特异性强, 操作简便, 样品无须提取可直接用于测定。

## 实验材料

**PO 的人工抗原** PO 在钨碳催化下加压氢化, 还原为磷酸二乙基对氨基苯酯, 再通过重氮化反应与中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)血蓝蛋白(hemocyanin, 本实验室分离提纯, 超速离心纯)偶合成人工抗原。载体蛋白的分子量以  $3 \times 10^6$  计。PO 按磷含量计算与载体蛋白的分子数之比为 670:1。

**抗血清** 日本大耳白家兔免疫 4 次, 前 2 次间隔 1 个月, 以后隔 2 个月免疫 1 次。前 3 次免疫时人工抗原与 Freund 完全佐剂相混合, 最后 1 次用 Freund 不完全佐剂, 制成稳定乳剂。背部皮内多点注射, 每次注射 PO-血蓝蛋白  $1.2 \text{ mg/kg}$ 。末次免疫后 3 个月放血分离血清。

$[^3\text{H}]\text{PO}$  由本实验室合成。先由乙醛经催化加氘制备成  $[^3\text{H}]\text{乙醇}$ , 然后与二氯磷酸对硝基苯酯反应, 即得  $[^3\text{H}]\text{PO}$ , 比放射性  $111 \text{ GBq/mmol}$ 。

**牛血清白蛋白(BSA)包被的活性碳(BSA-C)** 经活化处理的粉末状药用活性碳, BSA 和  $10 \text{ mM}$  磷酸缓冲盐水(PBS,  $\text{pH } 6.4$ ), 以  $10:1:100(\text{w:w:w})$  相混, 磁力搅拌  $30 \text{ min}$ 。

**PO 标准品** 本所合成, 分析纯。

## 方法和结果

**血清内酯酶的抑制** 兔血清内 A 类酯酶及胆碱酯酶迅速分解 PO, 使免疫分析无法进行, 故需首先抑制这些酯酶。

PO 在丙二醇-PBS 中的紫外吸收峰在  $275 \text{ nm}$ (图 1)。当 PO 溶液中含有兔血清时, 呈  $265 \text{ nm}$  和  $295 \text{ nm}$  双峰, 在  $37^\circ\text{C}$  放置  $1 \text{ h}$ , 出现  $400 \text{ nm}$  新吸收峰, 系分解产物对硝基酚的特异吸收峰(图 2)。终浓度  $30 \text{ mM}$  的 EDTA- $\text{Na}_2$  和  $1 \text{ mM}$  的催醒宁(1,3,3-三甲基-5-二甲氨基甲酰氧基咪唑满盐酸盐, CXN) 完全抑制血清内酯酶的活性, PO 血清溶液在  $37^\circ\text{C}$  放置  $1 \text{ h}$  前后所测光谱曲线完全合一(图 3)。

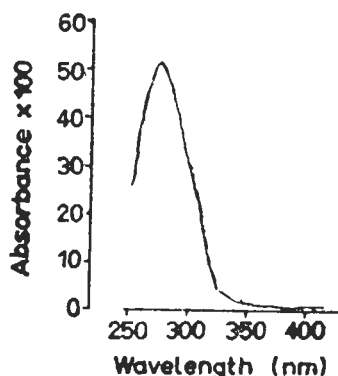


Fig 1. UV spectrum of paraoxon (PO,  $100 \mu\text{M}$ ) in 1, 2-propanediol-PBS. The curves scanned before and after incubation at  $37^\circ\text{C}$  for  $3 \text{ h}$  were identical.

### 抗血清的质量鉴定

1. 滴度 不同稀释度抗血清经抑制血清内酯酶后, 与  $0.50 \text{ ng} [^3\text{H}]\text{PO}$  反应, 根据测值绘滴度曲线, 取抗血清稀释度 1:1000 (结合率为 48%) 为工作滴度。

2. 亲和力 按 Scatchard 作图法测得亲和力常数  $K = 2.13 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ , 自由能改变  $\Delta G = -11.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ 。

3. 特异性 测试了 PO 类似物, 代谢物和有机磷农药等 8 个化合物对  $[^3\text{H}]\text{PO}$  的交叉抑制反应。PT 的交叉反应接近 1%。PO 的分

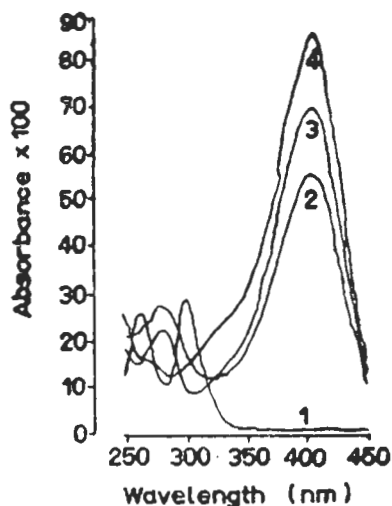


Fig 2. Increase of uv absorbance at 400 nm by PO in rabbit serum. 1. UV spectrum of PO ( $100 \mu\text{M}$ ) in 5% serum-1, 2-propanediol-PBS was characterized by double peaks. 2. After the same PO solution was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 1 h, absorbance peak at 400 nm appeared. 3. PO ( $100 \mu\text{M}$ ) in 10% serum-1, 2-propanediol-PBS was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 1 h, the peak at 400 nm was taller than in curve 2. 4. Sodium nitrophenol ( $100 \mu\text{M}$ ) in 1, 2-propanediol-PBS.

解产物及结构类似物不产生交叉反应。它们是: 二乙基磷酸酯, 对硝基酚钠, 内吸磷, 敌敌畏, 敌百虫, 乐果, 马拉硫磷。

**温度对抗原抗体复合物(PO·Ab)离解速度的影响** 在已达平衡的反应系统中加 BSA-C

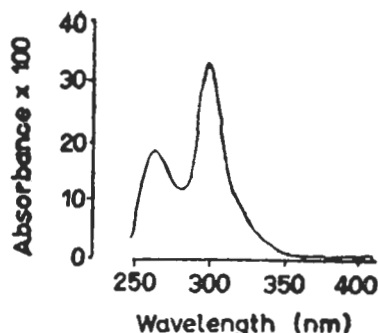


Fig 3. Inhibition of hydrolysis of PO ( $100 \mu\text{M}$ ) in 10% treated serum-1,2-propanediol-PBS by EDTA- $\text{Na}_2$  (30 mM) and CXN (1 mM) previously. The curves scanned before and after incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 1 h were identical, with no absorbance peak at 400 nm.

吸附除去游离  $[^3\text{H}]\text{PO}$ , 反应向离解方向进行。以  $\log[\text{PO} \cdot \text{Ab}]$  对反应时间作图, 求得  $1-2, 10$  和  $23.5^\circ\text{C}$  时的离解速度常数分别为  $4.70 \times 10^{-3}$ ,  $1.55 \times 10^{-2}$  和  $2.38 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ , PO·Ab 半离解时间分别为 147, 44.8 和 2.9 min。

**测定步骤和标准曲线** 0.20 ml 抗血清 PBS (含 30 mM EDTA 和 1 mM CXN) 溶液, 加 0.1 ml 不同浓度 PO 标准液或待测样品, 15 min 后加 0.1 ml  $[^3\text{H}]\text{PO}$  (0.50 ng)。在室温 ( $18-35^\circ\text{C}$ ) 放置 0.5 h, 浸入冰水迅即冷至  $0-2^\circ\text{C}$ , 加预冷的 BSA-C 0.05 ml, 摇匀后立即离心 ( $3000 \text{ rpm} \times 12 \text{ min}$ ), 上清液倾于玻璃纤维滤纸上, 纸片浸入 3 ml 闪烁液, 放置 3 h 以上, 液闪测定 cpm。

根据 24 次实验平均值, 以  $\text{logit } B/B_0$  值对标准 PO 量的对数值作图, 得线性良好的标准曲线 (图 4)。抑制 50%  $[^3\text{H}]\text{PO}$  结合的标准 PO 量 ( $I_{50}$ ) 为 0.66 ng。0.20 ng 点的  $B/B_0$  值为  $76 \pm 6\%$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ), 本法最小检出量为 0.20 ng。

### 精密度和准确性

1. 批内精密度 在 50% 兔血溶液中加入不同量 PO 作平行管测定 ( $n = 6$ ), 测得值分别为  $0.54 \pm 0.03$ ,  $1.81 \pm 0.15$ ,  $2.16 \pm 0.15 \text{ ng}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ), 变异系数 CV 值依次为 5.6, 8.3, 6.9%。

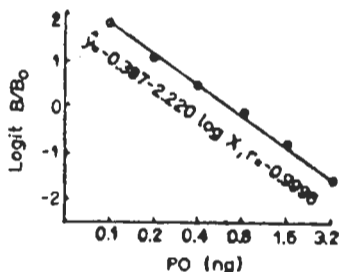


Fig 4. Standard curve of RIA for PO.

2. 批间精密性及准确性 4批实验,每批用1只兔,在50%兔血液中加入不同量PO,各批实验间的误差及回收率列于表1.各点CV值在9-12%间(11±1%).平均回收率102±6%.

Tab 1. Precision and accuracy of assay of PO added in blood of 4 rabbits.  $\bar{x} \pm SD$

Added (ng)	Found (ng)	Recovery (%)	CV (%)
0.20	0.21±0.02	103±10	9.5
0.40	0.38±0.04	95±11	11.4
0.80	0.80±0.08	100±10	10.0
1.60	1.78±0.22	111±14	12.4
3.20	3.30±0.38	103±12	11.5

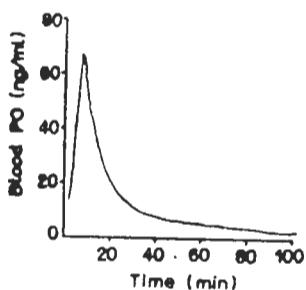


Fig 5. PO concentrations in rabbit blood following PO 150 µg/kg im.

测定方法初试结果 兔 im PO 150 µg/kg. 于中毒前后不同时间由颈动脉插管放血,以 EDTA-Na<sub>2</sub> 及 CXN 抑酶,测得全血中 PO 含

量变化见图5.家兔染毒后血内迅速出现PO, 3-5 min即达峰值,随即迅速下降,这种速升速降的血内浓度变化符合有机磷毒剂的毒理学特点.

## 讨 论

本法的灵敏度虽较高,但仍有改进余地.例如,由于其它实验目的,免疫兔放血时间在末次免疫后3个月,而不是通常的7-10 d,对抗血清质量可能有影响;再如, [<sup>3</sup>H]PO 的比放射性也还可以提高.

Ercegovich 等<sup>(3)</sup>首次报告了PT的RIA,该法与本文报告的PO的RIA各项参数比较列于表2.他们没有采用酯酶的抑制剂,这可能是各项参数较差的重要原因之一.我们的经验是必须保证血清内酯酶的完全抑制.实验证明单用 EDTA-Na<sub>2</sub> 或 CXN 均不足以完全抑制酯酶. Lober 等<sup>(4)</sup>报告获得了兔抗PO抗体,但未见PO的RIA测定数据.他们采用琥珀酰基作为人工抗原的间隔基团,所得抗血清与PO结合的K值仅 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup>M<sup>-1</sup>,与PT的交叉反应高达8.8-13.8%.

Tab 2. Comparison between RIA methods for parathion (PT) and PO

RIA for	Antiserum K(M <sup>-1</sup> )	Antiserum titre	[ <sup>3</sup> H]Ligand Detection limit (ng)
PT <sup>(3)</sup>	1.5 × 10 <sup>7</sup>	1:20	11.1
PO	2.1 × 10 <sup>8</sup>	1:1000	111

## 参 考 文 献

- 1 Sans WW. *J Assoc Off Anal Chem* 1978;61:837
- 2 Edwards RW, Nonnemaker KA, Cotter RL. *NBS Spec Publ* 1979; 519 (Trace Org Anal: New Front Anal Chem):87-94
- 3 Ercegovich CD, Vallejo RP, Gettig RR, Woods L, Bogus ER, Mumma RO. *J Agric Food Chem* 1981; 29:559
- 4 Lober M, Krantz S, Herrmann I. *Acta Biol Med Ger* 1982;41:487

**RADIOIMMUNOASSAY FOR PARAOXON**

RONG Kang-tai, XU Qin-hui, SHAO Ru-xin, GONG Xiong-qi

*(Inst Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100800)*

**ABSTRACT** Having effectively inhibited serum esterases for preventing enzymic hydrolysis of paraoxon during assay, the sensitivity of RIA for paraoxon was 0.20 ng (0.72 pmol). Untreated blood sample could be assayed directly. Anti-paraoxon antiserum was very specific with the affinity constant of  $2.13 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  and working titre of 1:1000. At

1-2, 10 and 23.5°C, the rate constants for dissociation of [<sup>3</sup>H]paraoxon-antibody complex were  $4.70 \times 10^{-3}$ ,  $1.55 \times 10^{-2}$  and  $2.38 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ , respectively.

**KEY WORDS** paraoxon; radioimmunoassay; serum esterases; antibody affinity; antigen-antibody complex