

· 研究论文 ·

溴氰菊酯酶联免疫吸附分析方法研究

张帮红, 施海燕, 王鸣华*

(南京农业大学 植物保护学院 农药科学系, 农业部作物病虫害监测与防控重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

摘要:建立了定量测定溴氰菊酯间接竞争酶联免疫吸附分析方法 (ic-ELISA)。合成了半抗原 1-羧基-(3'-苯氧基苯基)甲基-3-(2', 2'-二溴乙基)-2, 2-二甲基环丙基羧酸酯 (Med) 和 N-2-(羧基丙基)氨基甲酰基-(3'-苯氧基苯基)甲基-3-(2', 2'-二溴乙基)-2, 2-二甲基环丙基羧酸酯 (Di)。分别采用碳二亚胺法和混合酸酐法将半抗原与牛血清蛋白 (BSA) 和卵清蛋白 (OVA) 偶联制备了免疫原 Di+BSA 和包被原 Di+OVA、Med+OVA。将制得的溴氰菊酯免疫原免疫动物获得多克隆抗体, 经间接非竞争 ELISA 法测得其效价为 2.5×10^5 。通过对甲醇含量、离子强度、pH 值等影响因素进行异源分析条件的优化, 确立了溴氰菊酯间接竞争酶联免疫分析的最佳检测条件 (30% 甲醇、氯化钠 0.4 mol/L, pH 7.5), 并建立了标准竞争曲线。该方法的 IC_{50} 值为 0.55 ± 0.05 mg/L, 检测限 (IC_{10}) 为 3.76 ± 0.35 μ g/L, 对大多数拟除虫菊酯无交叉反应。分别在自来水、河水和土壤样品中添加 0.05~5.0 mg/L (或 mg/kg) 的溴氰菊酯, 回收率分别为 89.7%~106.8%、82.4%~101.7%、75.6%~97.8%。

关键词: 溴氰菊酯; 酶联免疫吸附分析; 多克隆抗体

中图分类号: R 392.11; S 482.3

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2009)02-0261-08

Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Deltamethrin

ZHANG Bang-hong SHI Hai-yan WANG Ming-hua*

(Department of Pesticide Science, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Key Laboratory of Monitoring and Management of Crop Diseases and Pest Insects Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

Abstract An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) was developed for the quantitative detection of deltamethrin. The haptens of deltamethrin 1-carboxy-(3'-phenoxyphenyl)methyl-3-(2', 2'-dibromoethyl)-2, 2-dimethylcyclopropanecarboxylate (Med) and N-2-(carboxypropyl) carbamoyl-(3'-phenoxyphenyl)methyl-3-(2', 2'-dibromoethyl)-2, 2-dimethylcyclopropanecarboxylate (Di) were synthesized. Di was conjugated with bovine serum albumin (BSA) as immunogen (Di+BSA) by carbodiimide method and coating antigens (Di+OVA, Med+OVA) of deltamethrin were prepared by conjugating these two haptens with ovalbumin (OVA) by mixed anhydride method. Polyclonal antibodies were obtained from rabbits immunized with immunogen and the titer of the freeze-dried powder (2.5×10^5) was determined by indirect non-competitive ELISA procedure. Standard competitive curve of the optimized ic-ELISA for deltamethrin was developed. Thus the optimized assay conditions such as concentration of methanol (30%), ionic strength (NaCl 0.4 mol/L), pH value (7.5)

收稿日期: 2008-11-07 修回日期: 2009-02-20

作者简介: 张帮红 (1977-), 男, 安徽怀远人, 硕士研究生, E-mail 2006102115@njau.edu.cn* 通讯作者 (Author for correspondence); 王鸣华 (1961-), 男, 山西垣曲人, 教授, 博士生导师, 主要从事农药残留与环境毒理研究工作, 联系电话: 025-84395479; E-mail wangmh@njau.edu.cn

基金项目: 国家高技术研究发展规划 ("863"计划) 项目 (2006AA108447)。

were investigated and obtained by analysis of heterologous The value of 50% inhibition of antibody binding (IC_{50}) for deltamethrin was 0.55 ± 0.05 mg/L, and the low detection limit (IC_{10}) was 3.76 ± 0.35 μ g/L. This ELISA assay had no cross-reactions significantly with other major pyrethroids Tap water, river water and soil samples were spiked with deltamethrin at 0.05~5.0 mg/L (or mg/kg), the average recoveries were in the range of 89.7%~106.8%, 82.4%~101.7%, 75.6%~97.8% respectively.

Key words deltamethrin; enzyme-linked immunosorbent assay; polyclonal antibody

溴氰菊酯 (deltamethrin) 是 1974 年 Elliott 等人开发的合成拟除虫菊酯类杀虫剂^[1], 因具有杀虫谱广、活性高、对哺乳动物低毒^[2]等特点而被广泛应用。传统的溴氰菊酯残留检测方法主要有气相色谱法和高效液相色谱法^[3-5], 这些方法前处理复杂、耗时、不适于大批量样品的现场检测。酶联免疫分析法以其快速、灵敏、廉价、可用于大批量样品检测的优点在农药残留检测中得到了广泛应用。与大多数农药一样, 溴氰菊酯不具有免疫原性, 需要对其结构进行修饰, 合成其类似物, 再与载体蛋白偶联制备出人工抗原, 最终获得有特异性的抗体。近年来, 对拟除虫菊酯酶联免疫分析方法的研究报道较多, 半抗原的设计主要集中在对其芳香族部位^[6-8]、环丙烷部位^[9-10]进行修饰。Lee 等^[9]利用溴氰菊酯水解后的产物二溴菊酸与 α -羟基-3-苯氧基苯乙酸反应合成其类似物的方法, 对溴氰菊酯的氰基部位进行修饰制备了半抗原, 并建立了间接竞争 ELISA 分析方法, 可用于检测水、土和谷物^[11]中溴氰菊酯的残留, 具有较高的回收率。笔者采用不同方法对溴氰菊酯的氰基部位进行修饰制备了半抗原, 获得了特异性强的抗体, 并建立了用于检测水和土壤中溴氰菊酯残留的间接竞争酶联免疫分析方法。现将结果报道如下。

1 实验部分

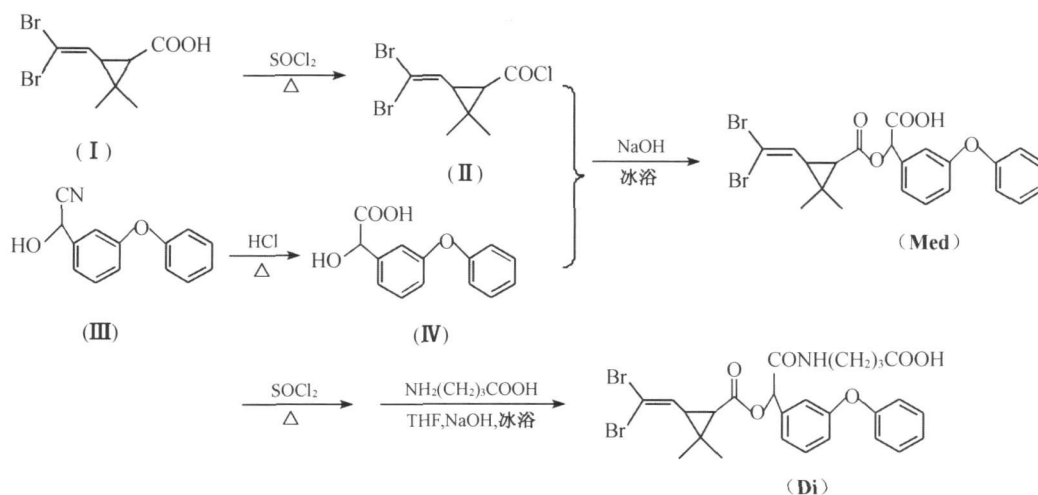
1.1 仪器与试剂

LC-MS/DECA 液质联用仪 (Finnigan 公司); DRX 500 核磁共振仪 (Bruker 公司); Infinite M 200 型酶标仪 (Tecan 公司); DU⁵ 800 核酸蛋白分析仪; AllegraTM 64R Centrifuge 高速冷冻离心机 (Beckman 公司); Wellwash Plus 型洗板机 (Thermo 公司); DNP-9052 新型电热恒温培养箱 (宁波江南仪器厂)。98% 溴氰菊酯、92% 甲氰菊酯、92% 高效氯氟菊酯、95% 氯菊酯、96% 氯氰菊酯、98% 氰戊菊酯、98% 的二溴菊酸及 95% 的 α -氰基-3-苯氧基苄醇 (氰醇), 均由南京红太阳集团提供; 牛血清蛋白 (BSA)、卵清蛋白 (OVA)、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (Goat anti-rabbit IgG/HRP)、弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂、邻苯二胺 (OPD) 及吐温-20 (Tween-20), Signa 公司产品; 其他试剂均为分析纯。实验动物为新西兰大白兔 (体重 1.5~2.0 kg)。

磷酸盐缓冲液 (PBS): 0.01 mol/L, pH 7.4 储备液: 用无水甲醇配制浓度为 100 mg/L 的溴氰菊酯标准溶液。

1.2 溴氰菊酯半抗原的合成

半抗原的合成路线如下:



1.2.1 α -羟基-3-苯氧基苯乙酸(氰酸)的合成

称取氰醇(III) 2.37 g (10 mmol)于 50 mL 三口烧瓶中,加入 10 mL 浓盐酸,60℃下搅拌反应 2 h,用 20 mL \times 2 乙酸乙酯提取产物,10 mL \times 2 水洗,10 mL \times 2 饱和碳酸氢钠溶液萃取,水相用浓盐酸调节 pH 至 2。再依次用 20 mL \times 2 乙酸乙酯提取,合并有机相,无水硫酸镁干燥。减压浓缩,得氰酸的粗产物,用硅胶柱层析[依次用氯仿-石油醚(1:1,体积比) 20 mL 和丙酮 100 mL 洗脱]提纯,收集丙酮部分馏分,浓缩得无色晶体(IV)。

1.2.2 1-羧基-(3'-苯氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯(Med)的合成

称取二溴菊酸(I) 3.04 g (10 mmol)于 100 mL 三口烧瓶中,加入 10 mL 氯化亚砷,搅拌回流 2 h,减压浓缩去除过量的氯化亚砷,得 3.17 g 黄色液体——酰氯(II),将其溶于 15 mL 四氢呋喃中备用。在另一 100 mL 三口烧瓶中,加入氰酸(IV) 2.44 g (10 mmol),搅拌下加入 2 mol/L 的氢氧化钠溶液 3 mL 和酰氯(II)的四氢呋喃溶液,冰浴下搅拌反应 4 h,用 30 mL \times 2 乙酸乙酯提取,弃去有机相。用浓盐酸调节水相 pH 值至 2,用 30 mL \times 2 乙酸乙酯萃取,10 mL \times 2 盐酸(1 mol/L)洗涤,10 mL \times 2 水洗,无水硫酸镁干燥,减压浓缩得到 Med 粗产物。用硅胶柱层析纯化,依次用体积比为 1:19(20 mL)、1:9(20 mL)、1:6(20 mL)、1:4(100 mL)的乙酸乙酯-石油醚混合溶剂梯度洗脱,收集 1:4 洗脱部分馏分,浓缩,得到淡黄色油状产物 Med 2.10 g 产率约 40%。

1.2.3 N-2-(羧基丙基)氨基甲酰基-(3'-苯氧基苯基)甲基-3-(2',2'-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙基羧酸酯(Di)的合成 称取 Med 2.0 g (3.82 mmol)于 100 mL 三口烧瓶中,加入 10 mL 氯化亚砷,搅拌回流 2 h,减压浓缩,得 Med 酰氯(黄色油状液体) 2.17 g,将其用 15 mL 四氢呋喃溶解,并在 4℃下冷却,备用。称取 4-氨基丁酸 0.41 g (3.98 mmol)于另一 100 mL 三口烧瓶中,加入 2 mL 4 mol/L 的氢氧化钠溶液,冰浴下搅拌。分 5 次加入 Med 酰氯的四氢呋喃溶液,每次间隔 10 min,在后 4 次加料的同时,用 4 mol/L 的氢氧化钠溶液调节体系的 pH 值为 12,加液完毕,冰浴下继续搅拌反应 3 h,用浓盐酸调节反应液的 pH 值至 2,用 30 mL \times 2 乙酸乙酯萃取,10 mL \times 2 水洗,无水硫酸镁干燥,减压浓缩,得到黄色的油状物。用薄层层析纯化,展开剂为:乙酸乙酯-石油醚-乙酸(体积比 28:67:5),洗脱液浓缩,得 1.05 g

黄色油状目标产物 $D_iR_i = 0.36$ 产率约为 43%。

1.3 人工抗原的制备与鉴定

将所得半抗原 D 采用碳二亚胺法^[12]与牛血清蛋白(BSA)偶联制备免疫抗原,分别将 Med 和 D 采用混合酸酐法^[13]与卵清蛋白(OVA)偶联获得包被抗原。将偶联物置于 PBS 中 4℃透析,除去未结合的小分子化合物。根据半抗原、载体蛋白和偶联物的紫外扫描图谱(200~400 nm)鉴定半抗原是否与载体蛋白有效偶联,并在选定波长(280 nm)下,根据三者的紫外吸收值计算摩尔吸光系数(ϵ),根据公式:结合比 = $[(\epsilon_{\text{偶联物}} - \epsilon_{\text{载体蛋白}}) / \epsilon_{\text{半抗原}}]$,计算半抗原与载体蛋白的结合比。

1.4 抗体的制备与纯化

皮下注射免疫新西兰大白兔。首次免疫用弗氏完全佐剂等体积乳化免疫原,免疫剂量为 1.0 mg/kg(按 BSA 量计),3 周后加强免疫,用弗氏不完全佐剂等体积乳化免疫原,免疫剂量为 1.5 mg/kg(按 BSA 量计)。以后每隔两周加强免疫 1 次,共加强免疫 4 次。初次免疫前以兔耳缘静脉采血分离血清作阴性对照。从第 2 次加强免疫开始,每次加强免疫后 8 d 通过耳缘采血测定抗血清效价。由心脏采全血,分离抗血清,采用辛酸-硫酸铵法纯化抗体^[14],经冷冻干燥后于 -20℃冰箱中保存。

1.5 溴氰菊酯抗体效价测定、工作浓度的确定及特异性考察

用间接非竞争酶联免疫分析方法测定抗体效价,经方阵实验法确定工作浓度^[13],当 OD₄₉₀值约为 1.0 时,抗血清或冻干粉稀释倍数即为抗体的效价^[15],用量较少的抗原抗体浓度(包括同源和异源分析)即为它们的最适工作浓度,每个浓度设 4 次重复,取平均值。在最适工作浓度下,按间接竞争 ELISA 操作^[16],建立溴氰菊酯的竞争曲线,选择抑制中浓度(IC₅₀)最低的组合进行条件优化。

1.6 溴氰菊酯 ELISA 分析方法的条件优化

溴氰菊酯在水中的溶解度小,但在甲醇中其溶解性较好,且在一定范围内甲醇对空白值和灵敏度的影响较其他溶剂(DMF、丙酮等)的影响小,故本实验以甲醇作溶剂。先后按间接竞争 ELISA 法分别考察不同甲醇含量(体积分数 5%~40%)、离子强度(0.1~0.5 mol/L 氯化钠)及 pH 值(5.5~9.5)分别用 1.0 和 0.1 mol/L 的盐酸、氢氧化钠调节的 PBS 溶液对体系的影响。以溴氰菊酯浓

度的对数值为横坐标,以结合率($B/B_0, \%$)为纵坐标,绘制溴氰菊酯的竞争曲线,其中 B 为加样孔测得的 OD_{490} 的平均值; B_0 为空白孔 OD_{490} 的平均值。并求得抑制中浓度(IC_{50}),选用 IC_{50} 值最低的体系作为最佳检测条件,进行下一步测定。

1.7 标准竞争曲线的建立和交叉反应率的测定

以优化后的甲醇浓度为基准,将溴氰菊酯储备液按梯度稀释法制备成浓度分别为 $10.5, 1.0, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005$ mg/L的系列标准溶液。在以上优化后的条件下按间接竞争ELISA法操作求得溴氰菊酯及其结构类似化合物定量检测标准竞争曲线,计算农药的 IC_{50} 值及最低检测限(IC_{10}),设3次重复。并依照公式:交叉反应率 $CR(\%) = [IC_{50}(\text{溴氰菊酯})/IC_{50}(\text{结构类似物})] \times 100$,求出抗体与其结构类似农药及其代谢物的交叉反应率。

1.8 回收率实验

分别取当地秦淮河水(经过滤)及自来水,用含体积分数(下同)为30%甲醇的PBS溶液稀释10倍后,量取5份(20 mL/份)于100 mL三角瓶中,分别添加 $0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0$ mg/L的溴氰菊酯,各设一空白对照,进行测定。称取5份(10 g/份)土壤(南京本地棕壤土,风干,过 0.125 mm筛),设一空白对照,添加系列浓度($0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0$ mg/kg)的溴氰菊酯后混匀,风干,放置过夜。加入15 mL甲醇,于快速混匀器上振荡2 min,静置5 min后移入250 mL具塞三角瓶中剧烈振荡20 min,用10 mL甲醇洗入离心管,置于高速离心机在 6000 r/min下离心10 min,取上清液3 mL于10 mL容量瓶中,用PBS定容,摇匀,待测。用上述间接竞争ELISA法对处理后的样品进行分析,每个浓度设4次重复,计算回收率和相对标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 半抗原分子的结构鉴定

半抗原 Di ESI-MS m/z : $632[M + Na^+]$, $M = 609$,两个同位素峰分别为 634 和 630 ,相对强度约为 632 峰的 $1/3$ 说明该物质有2个溴原子; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ 1.24 (s, 3H, CH_3), 1.25 (s, 3H, CH_3), 2.10~2.15 (m, 1H, C=C-CH), 2.22 (s, 1H, $CHCOO$), 2.60~2.65 (m, 2H, $-CH_2-$), 3.17 (t, 2H, CH_2COO), 4.72 (t, 2H, CH_2N), 5.98 (s, 1H, $OCHCON$), 6.53 (d, 1H, =CH), 7.0~7.4 (m, 9H, -ArH)。

半抗原 Med ESI-MS m/z : $547[M + Na^+]$, $M = 524$, 1H NMR ($CDCl_3$), δ 1.25 (s, 3H, CH_3), 1.27 (s, 3H, CH_3), 2.05 (d, 1H, $CHCO$), 2.12~2.15 (m, 1H, C=C-CH), 5.90 (s, 1H, $OCHCOO$), 6.82 (d, 1H, =CH), 7.0~7.4 (m, 9H, -ArH)。

2.2 人工抗原紫外光谱鉴定及结合比的测定

由图1、图2可以看出偶联物的紫外吸收光谱具有载体蛋白和半抗原的特征,吸光值明显变化,说明半抗原已与载体蛋白成功偶联,按公式算得免疫原与包被原结合比分别为 $34:1(Di+BSA)$, $12:1(Di+OVA)$, $28:1(Med+OVA)$ 。

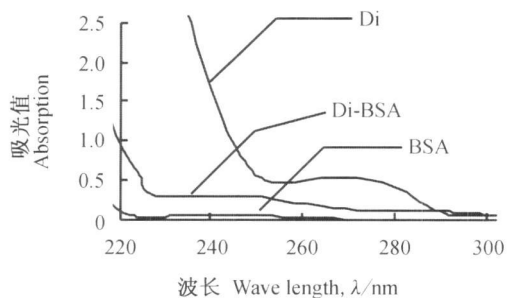


图1 半抗原、免疫原、牛血清蛋白(BSA)紫外扫描图谱
Fig. 1 The ultraviolet absorption spectra of haptens, immunogen and BSA

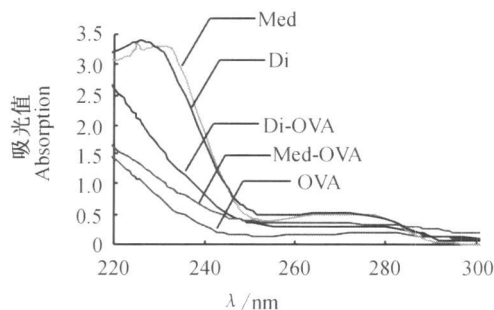


图2 半抗原、包被原、卵清蛋白(OVA)紫外扫描图谱
Fig. 2 The ultraviolet absorption spectra of haptens, coating antigen and OVA

2.3 抗体效价测定及工作浓度的确定

四次加强免疫后,抗血清的效价达到 2.5×10^4 ,抗体纯化后的冻干粉效价为 2.5×10^5 。以 $Di+OVA$ 、 $Med+OVA$ 为包被抗原,以冻干粉为抗体,根据方阵滴定原理,分别采用倍比稀释法配制 $64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5$ mg/L系列浓度药液,测得抗原与抗体的最适工作浓度为:包被抗原 $Med+OVA$ 浓度 8 mg/L,抗体 $Di+Ab$ 浓度为 4 mg/L;包被抗原 $Di+OVA$ 浓度 2 mg/L,抗体 $Di+Ab$ 浓度

为 1 mg/L。

在最适工作浓度下, 以含 30% 甲醇的 PBS 溶液配制浓度分别为 50、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005 mg/L 的溴氰菊酯系列溶液, 采用间

接竞争 ELISA 法对其特异性进行测定, 绘制竞争曲线, 分别求出同源及异源分析下的 IC_{50} 和 IC_{10} 值。结果见表 1。

表 1 溴氰菊酯 ic-ELISA 法同源与异源分析结果

Table 1 the analysis results of homologous and heterologous for deltamethrin by ic-ELISA

包被抗原 Coating antigen	抗体 Antibody	抑制中浓度 (IC_{50} , mg/L)	灵敏度 (IC_{10} , mg/L)
M ed-OVA	D i-A b	1.07	0.0036
D i-OVA		26.7	0.059

从表 1 中看出, D i-OVA、D i-A b 组合的 IC_{50} 值比 M ed-OVA、D i-A b 组合的 IC_{50} 值高约 26 倍, 说明异源分析的灵敏度高于同源分析。依此选定异源组合用于下一步条件优化。

2.4 ELISA 分析条件的优化

实验发现, 当甲醇体积分数从 5% 增加至 40% 时, 其吸光值约增加 0.1; 当离子强度由 0.1 mol/L 增加至 0.5 mol/L 时, 吸光值约降低 1.0。这表明一定量的甲醇可增加溴氰菊酯在水中的溶解度, 促进抗原抗体的结合反应, 使吸光度值增加, 尤其是对亲和性低的抗原抗体更是如此, 这与相关文献报道^[14, 16, 17]一致; 离子的强度对溴氰菊酯 IC_{50} 值也产生了较大的影响, 离子强度升高, 其吸光值降低, 这可能是由于离子对抗原抗体的结合反应产生了强烈的抑制作用; pH 值在 5.5~9.5 之间时对溴氰菊酯 IC_{50} 值无明显影响。经测定, 甲醇含量为 30%、离子强度为 0.4 mol/L 和 pH 值为 7.5 时的 IC_{50} 值最低, 因此, 确定此条件为优化的 ELISA 分析条件。见图 3~5。

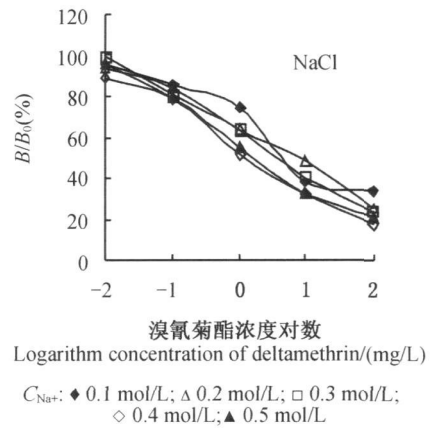


图 4 不同离子强度对溴氰菊酯 ic-ELISA 的影响
Fig. 4 ELISA competitive curves for deltamethrin containing various ionic strengths in PBS buffers

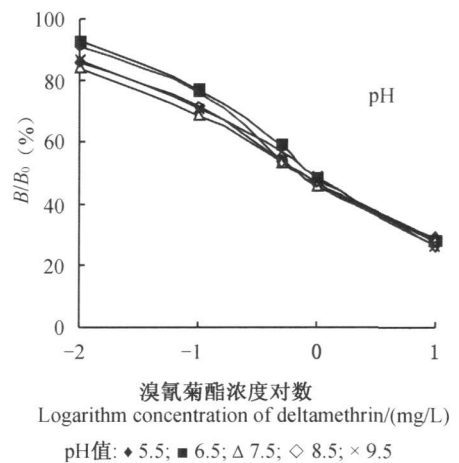


图 5 不同 pH 值对溴氰菊酯的 ic-ELISA 的影响
Fig. 5 ELISA competitive curves for deltamethrin in PBS buffers at various pH values

2.5 标准曲线的建立和交叉反应率测定

在优化的分析条件下, 建立了溴氰菊酯间接竞争 ELISA 标准竞争曲线 (如图 6)。标准曲线为 $B/B_0(\%) = -18.545 \log c + 45.15$ (c 为农药浓度, $r = 0.9955$), 线性范围为 0.005~100 mg/L,

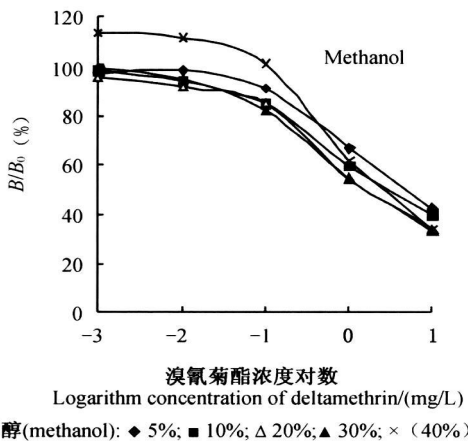


图 3 不同甲醇含量对溴氰菊酯 ic-ELISA 的影响
Fig. 3 ELISA competitive curves for deltamethrin with various concentrations of methanol in PBS buffers

IC_{50} 值为 0.55 ± 0.05 mg/L, 检测限为 3.76 ± 0.35 μ g/L。

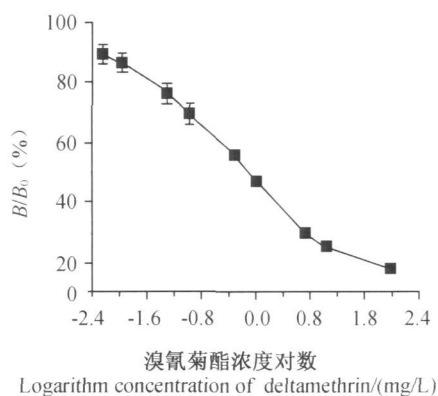


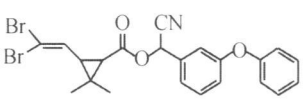
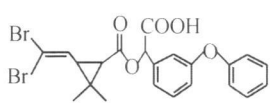
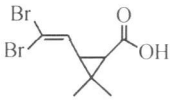
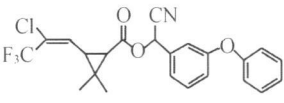
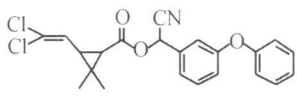
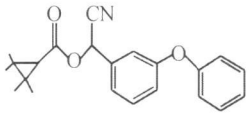
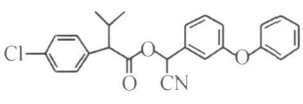
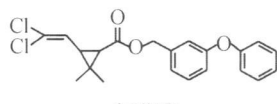
图 6 优化条件后溴氰菊酯间接竞争 ELISA 标准曲线

Fig. 6 Standard competitive curves of the optimized ELISA for deltamethrin

抗体与部分拟除虫菊酯农药及溴氰菊酯代谢物的交叉反应情况见表 2。可以看出, 抗体与氯氰菊酯有一定的交叉反应, 与甲氰菊酯基本上无交叉反应。其原因是由于溴原子与氯原子同属一族, 抗体对乙烯基上取代基团的识别能力为 $Br > Cl > CH_3$, 这与 Shan 等^[6]的研究结果一致。

表 2 溴氰菊酯抗体与其他拟除虫菊酯的交叉反应

Table 2 Cross-reactivity of antibody with other major pyrethroids

分析物 Analyte	抑制中浓度 IC_{50} /(mg/L)	交叉反应率 CR (%)	分析物 Analyte	抑制中浓度 IC_{50} /(mg/L)	交叉反应率 CR (%)
 溴氰菊酯 (deltamethrin)	0.55	100	 Med	0.03	> 100
 溴氰菊酸 (deltamethrinic acid)	5.79	9.46	 高效氯氟菊酯 (lambda-cyhalothrin)	1 995	0.027
 氯氰菊酯 (cypermethrin)	11.22	4.88	 甲氰菊酯 (fenpropathrin)	> 20 000	< 0.01
 氰戊菊酯 (fenvalerate)	> 20 000	< 0.01	 氯菊酯 (permethrin)	955	0.057

2.6 回收率的测定

测定结果表明, 自来水中离子含量低, pH 接近 7, 几乎不含有有机化合物; 河水中杂质相对较多, 需用含 30% 甲醇的 PBS 溶液稀释以消除其干扰。土壤样品经前处理后较接近优化后的条件。自来水、河水和土壤中的平均添加回收率见表 3。

3 结论

本研究以溴氰菊酯和 α -氰基-3-苯氧基苄醇为原料, 通过对溴氰菊酯的氰基部位进行修饰制备了半抗原。与 Lee^[9]设计的结构相比, 笔者所得半抗原的连接臂长度增加了 (以丙酸臂替代 α -氰基), 在简化合成方法的同时保留了待测物的特征结构, 符合 Friedl^[17]认为理想的半抗原应包括待测物的特征结构、连接臂一般以 C_{3-6} 为宜的理论。经同源、异源分析, 认为异源分析有较高的灵敏度, 其原因可能是在同源分析中使用了具有相同连接臂的包被原与目标化合物的竞争抗体, 产生了较大的背景反应。Lee 等制备的多克隆抗体用于检测溴氰菊酯的 IC_{50} 值为 0.13 mg/L, 用稀氢氧化钠处理溴氰菊酯的标准品使其异构化极大地提高了

表 3 溴氰菊酯在样品中的添加回收率

Table 3 Recoveries of deltamethrin from the fortified samples

样品 Samples	添加浓度 Spiked concentration /(mg/L or mg/kg)	平均回收率 \pm SD (%) Average recoveries \pm SD (n = 4)	相对标准偏差 RSD (%)
自来水 Tap water	5.0	97.1 \pm 2.2	2.3
	1.0	100.6 \pm 2.0	2.0
	0.5	106.8 \pm 3.9	3.7
	0.1	92.9 \pm 1.9	2.0
	0.05	89.7 \pm 3.3	3.7
河水 River water	5.0	85.7 \pm 2.9	3.4
	1.0	101.7 \pm 1.8	1.8
	0.5	95.1 \pm 3.5	3.7
	0.1	93.0 \pm 2.5	2.7
	0.05	82.4 \pm 3.7	4.5
土壤 Soil	5.0	85.2 \pm 1.9	2.2
	1.0	75.6 \pm 4.7	6.2
	0.5	97.8 \pm 5.1	5.2
	0.1	88.2 \pm 2.9	3.3
	0.05	76.6 \pm 6.2	8.1

方法的灵敏度, 最终该方法的 IC_{50} 值为 $4 \mu\text{g/L}$, 检测限达 $0.2 \mu\text{g/L}$ ^[9], 证实了半抗原的立体化学特征对免疫分析的特异性产生了重大影响^[18]。虽然该方法的灵敏度很高, 但该抗体特异性不强, 与溴氰菊酯、氯氰菊酯和高效氯氟氰菊酯等相关菊酯均有较大的交叉反应。本研究建立的间接竞争 ELISA 方法经分析条件优化后测得溴氰菊酯的 IC_{50} 值为 $0.55 \pm 0.05 \text{ mg/L}$, 检测限为 $3.76 \pm 0.35 \mu\text{g/L}$, 灵敏度稍低, 但特异性较强。分析其原因可能是因为增加了一个碳原子后, 连接臂长度增加了, 空间构象易发生改变, 影响了抗原抗体的识别, 从而降低了方法的灵敏度; 同时, 据文献报道, 抗体的特异性通常是由载体蛋白末端基团决定的^[9], 因而半抗原与不同的载体蛋白偶联也会对分析结果产生不同程度的影响。在自来水和河水中分别添加 $0.05 \sim 5.0 \text{ mg/L}$ 的溴氰菊酯, 回收率分别为 $89.7\% \sim 106.8\%$ 和 $82.4\% \sim 101.7\%$, 变异系数分别为 $2.0\% \sim 3.7\%$ 和 $1.8\% \sim 4.5\%$; 土壤中添加 $0.05 \sim 5.0 \text{ mg/kg}$ 的溴氰菊酯, 回收率为 $75.6\% \sim 97.8\%$, 变异系数为 $2.2\% \sim 8.1\%$ 。添加回收率均较高, 符合农药残留分析的要求, 可用于环境中溴氰菊酯残留检测。

参考文献:

[1] ELLIOTT M, FARNHAM A W, JANES N F, et al Synthetic

Insecticide with a New Order of Activity [J]. Nature, 1974, 248: 710-711.

- [2] MESTRES R, MESTRES G. Deltamethrin Uses and Environmental Safety [J]. Rev Environ Contam Toxicol, 1992, 24: 1-19.
- [3] ANGERER J RITTER A. Determination of Metabolites of Pyrethroids in Human Urine Using Solid-phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry [J]. J Chromatogr A, 1997, 695: 217-226.
- [4] PAVVAN F A, DALLGO R M, ZANELLA R, et al. Determination of Deltamethrin in Cattle Dipping Baths by High-performance Liquid Chromatography [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 174-176.
- [5] RAMESH A, BALASUBRAMANIAN M. Rapid Preconcentration Vegetable Oils and Butter Fat and Simultaneous Determination by Gas Chromatography-Electron Capture Detection and Gas Chromatography-Mass Spectrometry [J]. Analyst, 1998, 123: 1799-1802.
- [6] LEE H J SHAN G M, WATANABE T, et al. Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Pyrethroid Deltamethrin [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 5526-5532.
- [7] LEE H J SHAN G M, AHN K C, et al. Development of an Enzyme-linked Immunoassay for the Pyrethroid Cypermethrin [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52: 1039-1043.
- [8] QUEFFELEC A L, NODET P, HAELTERS J P, et al. Hapten Synthesis for a Monoclonal Antibody Based ELISA for Deltamethrin [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 1670-1676.
- [9] LEEN J M CADAM D P, SKERRITT J H. Development of Immunoassays for Type II Synthetic Pyrethroids I. Hapten Design and Application to Heterologous and Homologous

- Assays [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 520-534.
- [10] MAK SK, SHAN G M, LEE H J et al Development of Class Selective Immunoassay for the Type II Pyrethroid Insecticides [J]. Anal Chim Acta, 2005, 534: 109-120
- [11] LEE N J, BEASLEY H L, SKERRITT J H. Development of Immunoassays for Type II Synthetic Pyrethroids Assay Specificity and Application to Water, Soil and Grain [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 535-546
- [12] SHIHai-yan (施海燕), WU Hu-ming (吴慧明), CHENG Jing-li (程敬丽), et al 2 甲 4 氯人工抗原的合成与鉴定 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2004, 6(2): 20-24
- [13] ZHU Guo-nian (朱国念), MAO Li-jian (毛黎娟), SHIHai-yan (施海燕), et al 二氯喹啉酸人工抗原的合成与鉴定 [J]. Agric Sci China (中国农业科学), 2005, 38(1): 86-90.
- [14] WENGATZ I, STOUTAMIRE D W, GEE S J et al Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Detection of the Pyrethroid Insecticide Fenpropathrin [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 2211-2221
- [15] SHIHai-yan (施海燕), ZHU Guo-nian (朱国念), ZHENG Zun-tao (郑尊涛), et al 同源与异源分析对 ELISA 检测灵敏度和特异性的影响 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2005, 7(4): 349-352
- [16] LIBo (李波), SHIHai-yan (施海燕), WANG Ming-hua (王鸣华). 联苯菊酯酶联免疫吸附分析方法研究 [J]. Chinese J Anal Chem (分析化学), 2008, 36(1): 34-38.
- [17] FRIEJA J, SHIRLY J G, ROBERT O H, et al Use of Immunochemical Techniques for the Analysis of Pesticides [J]. Pestic Sci, 1989, 26(3): 303-317
- [18] YOU Hai-qin (尤海芹), ZHOU Yuan-yuan (周元元), LIU Shu-zhao (刘曙照). 拟除虫菊酯类农药半抗原合成方法进展 [J]. Modern Agrochemicals (现代农药), 2004, 3(4): 6-9.

(Ed JIN SH)

《中国植物保护学会 2009 年学术年会》第一轮通知

由中国植物保护学会主办,湖北省植物保护学会、华中农业大学、湖北省农科院、湖北省农业厅植保总站承办的“中国植物保护学会 2009 年学术年会”将于 2009 年 10 月 27~30 日在湖北省武汉市召开,会议主题为粮食安全与植保科技创新。主要内容包括: (1)召开第十次全国会员代表大会; (2)围绕大会主题,邀请院士、专家、学者和领导作大会专题报告; (3)分会场交流近年来植物保护领域取得的重大研究进展与研究成果。

现正全面征集会议论文,主要内容包括:

①重大病虫害鼠害灾变规律、监测预警与防控技术研究进展; ②重大病虫害鼠害无公害持续控制理论、技术与方法; ③现代植保高新技术及其产业化; ④外来生物入侵及植物检疫; ⑤转基因抗病虫、耐除草剂作物安全性。

要求论文为未曾公开发表的并能主要反映近年来取得的重要研究进展和成果,欢迎承担国家、部、省级研究项目的专家及广大植保科技工作者积极投稿。论文格式请参照《植物保护学报》格式撰写,论文和综述不超过 6000 字,研究简报不超过 1200 字,大摘要 1000 字以内。不需英文题目和英文摘要。第一作者限投一篇论文。第一页脚注附作者简介和通讯作者。

投稿方式:通过电子邮件或学会网站在线投稿(www.ijmchina.net),征文截止日期为 2009 年 8 月 31 日。

投稿费用:论文版面费(含审稿费)120 元/每版(不足一个版面按一个版面收费)。作者收到论文录用通知后,请及时将版面费汇到学会办公室。

联系人:文丽萍,宁云,胡静明 电话/传真:010-62815913/62811917

地址:北京圆明园西路 2 号中国农科院植保所转植保学会办公室

邮编:100193 电子信箱:cspp62@163.com

网址:www.ijmchina.net

2009 年 4 月 28 日