

· 专论与综述 ·

# 拟除虫菊酯类农药酶免疫分析方法研究进展

王春梅, 程敬丽, 刘毅华, 朱国念\*

(浙江大学 农药与环境毒理研究所, 杭州 310029)

**摘要:** 对拟除虫菊酯类单一农药残留和多残留酶免疫分析方法的研究进展进行了综述。在介绍单一农药残留酶免疫分析方法中半抗原分子设计和 ELISA 方法建立的基础上, 指出刚性连接臂是菊酯类农药免疫半抗原分子设计的一般原则, 包被原和免疫原采用不同的载体蛋白和不同结构的半抗原有利于菊酯类农药 ELISA 方法的建立。在介绍菊酯类农药多残留酶免疫分析方法时, 剖析了通用免疫半抗原的结构特点, 阐述了宽谱特异性抗体的筛选方法, 揭示了在菊酯类农药多残留酶免疫分析法中存在竞争半抗原的选择具有盲目性、宽谱特异性抗体对不同农药的特异性差异较大的问题。并对拟除虫菊酯类农药通用免疫半抗原设计及多残留酶免疫分析技术的发展趋势进行了探讨。

**关键词:** 拟除虫菊酯; 酶免疫分析; 半抗原设计; 农药残留

中图分类号: X592

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2008)01-0015-08

## Progress of Enzyme Immunoassays for Pyrethroids Insecticides

WANG Chun-mei, CHENG Jing-li, LIU Yi-hua, ZHU Guo-nian\*

(Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract** Enzyme immunoassay is a desirable method for detecting residues of pyrethroids insecticides. Recently many immunoassays methods for pyrethroids have been reported, but few focused on the multi-residue analysis of pyrethroids. The development of enzyme immunoassays for the determination of pyrethroid residues were reviewed, including hapten design, antibody preparation and immunoassay establishment and applications. Most of the studies showed that a rigid or shorter side chain in an immunizing hapten is important for the generation of sensitive and selective antibodies for pyrethroids. In addition, the advantages of the heterologous immunoassay were also pointed out. The structure characters of the general immunizing hapten were introduced, and the selective method of broad specific antibody was referred to. The key points in the multi-residue immunoassays, including the selection of the competitive hapten, and the specificity of the broad specific antibody to different pesticides were discussed. Finally, the development trends of general hapten design and multi-residue immunoassay of pyrethroids were summarized.

**Key words** pyrethroid; enzyme immunoassay; hapten design; pesticide residue

拟除虫菊酯类杀虫剂是一类以神经钠离子通道为作用靶标, 根据天然除虫菊素化学结构仿生

合成的杀虫剂。自 20 世纪 70 年代光稳定性拟除虫菊酯类杀虫剂问世以后, 目前已成为仅次于有机

收稿日期: 2007-07-18; 修回日期: 2007-10-22

作者简介: 王春梅 (1982-), 女, 博士研究生, 主要从事农药残留与免疫化学研究, E-mail wchunm@163.com; \* 通讯作者 (Author for correspondence): 朱国念 (1957-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事农药学相关领域的研究, 联系电话: 0571-86971220, E-mail zhuguan@zju.edu.cn

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (“863”计划) 资助项目 (2006AA10Z447); 浙江省自然科学基金 (Y305044).

磷的主要杀虫剂系列<sup>[1]</sup>。拟除虫菊酯为神经毒物,对鱼类、蜜蜂和家蚕的毒性较高<sup>[2,3]</sup>,也是环境和人类健康潜在的威胁物。人类长期食用含有残留拟除虫菊酯类农药的食物容易造成亚慢性或慢性中毒,因此各国越来越重视对该类农药在农副产品中残留的监控。

当前,我国农产品和环境中的拟除虫菊酯类农药残留超标严重,不仅带来了严重的生态环境问题,而且已成为影响我国农产品质量和国际竞争力的重要限制因素。农药残留检测是保障农产品质量安全的重要环节,也是发达国家设置贸易壁垒的重要技术手段。基于抗原-抗体分子识别的免疫分析技术,特别是酶联免疫吸附测定方法(ELISA, enzyme-linked immunoassay)对于特异、灵敏、简便、快速、在线检测农产品中农药残留具有其独特优势<sup>[4]</sup>。目前,国外已建立了百余种农药的免疫化学分析技术,针对40多种农药开发了商品化试剂盒,近年来国内这方面的研究也有较大的进展。国内外有关拟除虫菊酯类单一农药的ELISA方法已有很多报道,关于利用宽谱特异性抗体建立拟除虫菊酯类农药多残留ELISA方法也有一些报道,但所报道的宽谱特异性抗体对不同农药的交叉反应率相差太大<sup>[5]</sup>,不利于多残留检测的应用。为了进一步研究拟除虫菊酯类农药多残留酶免疫分析方法,获得菊酯类农药高亲和力、通用结构的抗体,笔者在前人<sup>[6]</sup>对单一菊酯类农药ELISA建立的一般方法进行介绍的基础上,重点介绍了单一菊酯类农药免疫半抗原的设计原则,另外还涉及了单一菊酯类农药异源ELISA方法建立的研究动态,并对拟除虫菊酯类农药多残留酶免疫分析方法的研究进展进行了归纳与分析,探讨了菊酯类农药通用免疫半抗原设计及多残留酶免疫分析技术的发展趋势。

## 1 单一拟除虫菊酯类农药残留的酶免疫分析研究

目前多种拟除虫菊酯类农药的单残留ELISA方法已经建立<sup>[7-18]</sup>,其中所采用的免疫半抗原结构、所获抗体类型及所建ELISA方法的灵敏度(IC<sub>50</sub>值)列于表1。

### 1.1 单一菊酯类农药免疫半抗原设计原则

农药小分子不具有免疫原性,只有反应原性,必须与大分子物质连接后才能刺激动物产生特异

性抗体,人工抗原决定了抗体的特异性和亲和性,最终影响免疫分析的质量。而半抗原的设计与合成对于抗体的获得以及建立免疫分析方法至关重要<sup>[4]</sup>。

拟除虫菊酯类农药具有不同的空间构型,为了获得高特异性抗体和建立高灵敏度的ELISA方法,研究者设计、合成了不同结构的免疫半抗原和竞争半抗原<sup>[19]</sup>。如表1所示,菊酯类单一农药ELISA方法优选的免疫半抗原结构可分为6类:①在拟除虫菊酯芳香族部位接上一个连接臂,如氯菊酯<sup>[9]</sup>、甲氰菊酯<sup>[10]</sup>、溴氰菊酯<sup>[14]</sup>、氯氟氰菊酯<sup>[16]</sup>、S-氰戊菊酯<sup>[17]</sup>;②在拟除虫菊酯的环丙烷部位接上一个连接臂,如氯菊酯<sup>[7,8]</sup>、溴氰菊酯<sup>[12]</sup>;③将菊酯的氰基部位水解后作为半抗原,如溴氰菊酯<sup>[12]</sup>;④将拟除虫菊酯苯氧基苄醇结构进行改造后作为半抗原,如氯氰菊酯<sup>[11]</sup>、溴氰菊酯<sup>[15]</sup>;⑤以菊酸衍生物作为半抗原,如溴氰菊酯<sup>[12]</sup>;⑥以酯键水解后的产物作为半抗原,如氟氰戊菊酯<sup>[18]</sup>。其中,以改变拟除虫菊酯芳香族部位结构为免疫半抗原的居多(①和④),这可能是因为拟除虫菊酯芳香族部位的抗原决定簇较少;另外在这些优选的免疫半抗原中,基本都保留了菊酸结构(农药本身不具有菊酸结构的除外),可见菊酸结构是菊酯类农药的重要抗原决定簇之一。

要获得针对农药的特异性抗体,所设计的半抗原在保留农药抗原决定簇部分的同时,还要具有能与大分子蛋白质偶联的活性基团。菊酯类单一农药ELISA方法优选的6类免疫半抗原结构中,均采用引入比较短(C<sub>1</sub>~C<sub>3</sub>)的连接臂,这与目前大多数学者认为的连接臂以3~6个C较适宜的结果不同<sup>[20]</sup>。有研究<sup>[12,13]</sup>认为这主要与菊酯的疏水性有关。在菊酯中引入较长的饱和链烃连接臂,进一步增加了半抗原的亲脂性,使得半抗原在与蛋白质偶联时容易发生折叠而影响其抗原决定簇部分,从而降低所产生抗体的亲和性,因此在设计菊酯类半抗原时要强调连接臂的刚性问题。

### 1.2 单一菊酯类农药人工抗原与抗体的制备

菊酯类农药ELISA方法的建立大多采用间接竞争法,建立间接竞争ELISA法必备的条件为人工免疫抗原和人工包被抗原的制备。半抗原与载体蛋白的偶联物称之为人工抗原,载体不仅仅是简单地增加半抗原的分子质量,更重要的是利用其强的免疫原性诱导机体产生免疫应答,对半抗原产生载体效应的作用<sup>[4]</sup>。对于同一种目标化合物,

表 1 免疫半抗原结构

Table 1 structures of immunogen haptens

分析物 Analyte	优选的免疫半抗原结构 Selected immunizing antigen haptens	抗体 <sup>a</sup> Antibody	IC <sub>50</sub> /( $\mu\text{g/L}$ )	文献 Reference
氯菊酯 permethrin		M	15	Stanker 1989 <sup>[7]</sup>
		M	10	Skerritt 1992 <sup>[8]</sup>
	<i>cis-</i> 	P	2.5	Shan 2000 <sup>[9]</sup>
甲氧菊酯 fenprothrin		P	20	Wengatz 1998 <sup>[10]</sup>
氯氰菊酯 cypermethrin	<i>trans-</i> 	P	13.5	Lee 2004 <sup>[11]</sup>
溴氰菊酯 deltamethrin		P	<sup>b</sup> 130/4 180/2 50/4	Lee 1998 <sup>[12,13]</sup>
		P	210/4	Lee 1998 <sup>[12,13]</sup>
		P	60/2	Lee 1998 <sup>[12,13]</sup>
		P	70/2	Lee 1998 <sup>[12,13]</sup>
		M	500	Queffelec 1998 <sup>[14]</sup>
		P	17.5	Lee 2002 <sup>[15]</sup>
		P	37.2	Gao 2006 <sup>[16]</sup>
		P	30	Shan 1999 <sup>[17]</sup>
氟氰戊菊酯 flucythrinate		M	33	Nakata 2001 <sup>[18]</sup>

注: <sup>a</sup>P 多克隆抗体, M 单克隆抗体; <sup>b</sup>/左侧为检测未异构化溴氰菊酯的 IC<sub>50</sub> 值, /右侧为检测异构化溴氰菊酯的 IC<sub>50</sub> 值。

Note: <sup>a</sup>P denotes polyclonal antibody, M denotes monoclonal antibody; <sup>b</sup>/ on the left-hand side of the slash represent IC<sub>50</sub> value of detect unisomerized compounds, <sup>b</sup>/ on the right-hand side of the slash represent IC<sub>50</sub> value of detect isomerized compounds.

包被原和免疫原通常不用同一种蛋白质偶联。制备菊酯类农药人工抗原,一般当包被载体蛋白采用牛血清白蛋白(BSA)时免疫载体蛋白采用甲状腺球蛋白(THY),当包被载体蛋白采用卵清蛋白(OVA)时免疫载体蛋白采用BSA。一般载体蛋白与半抗原的偶联方法有多种,对于菊酯类农药,其半抗原与载体蛋白偶联的活性基团大都是羧基和氨基,其偶联方法也普遍采用活性酯法和重氮化法。

人工抗原的制备为特异性抗体的获得提供了条件,而特异性抗体的制备是建立ELISA方法所必须的。对于菊酯类农药,一般采用常规方法制备单克隆抗体和多克隆抗体,用于检测单一目标农药时的抑制中浓度均在 $\mu\text{g/L}$ 级。表1结果显示,这些已获得的特异性抗体以多克隆抗体为主,采用单克隆抗体建立ELISA方法的只有氯氰菊酯<sup>[7,8]</sup>、溴氰菊酯<sup>[14]</sup>和氟氰戊菊酯<sup>[18]</sup>。

### 1.3 单一菊酯类农药异源ELISA方法的建立

在已建立的单一菊酯类农药的ELISA方法中,大多选用异源的ELISA方法,即所获抗体的免疫半抗原与包被半抗原的结构不同。以氯氰菊酯<sup>[11]</sup>为例, Lee设计、合成了8种半抗原,其建立氯氰菊酯ELISA方法所用的免疫半抗原和优选的包被半抗原结构如图1。以半抗原1和2为免疫半抗原,通过免疫获得了4种高效价的兔血清;若采用半抗原2为免疫半抗原,优选半抗原3和4作为包被用半抗原建立ELISA方法,结果发现其对氯氰菊酯的 $\text{IC}_{50}$ 值分别为26.5和41 $\mu\text{g/L}$ ,而其他免疫半抗原与包被抗原的组合对氯氰菊酯的 $\text{IC}_{50}$ 值都大于100 $\mu\text{g/L}$ ,因此,通常优选异源组合建立针对氯氰菊酯的ELISA方法。

在异源ELISA方法中,采用结构不同的包被原与免疫原,原因在于抗体对异源包被原的弱识别性(相对抗体对同源包被原的识别而言)可间接提高抗体对待检测农药的结合能力<sup>[21]</sup>。对于同一抗体采用不同结构的包被半抗原建立异源ELISA方法具有不同的灵敏度。在菊酯类农药酶免疫分析方法中,研究者通常采用设计、合成多种包被半抗原建立不同半抗原组合的ELISA方法,筛选灵敏度最好的组合进行方法优化与样品检测。在此过程中,包被半抗原的结构设计具有一定的随机性,所设计的包被半抗原的结构越多,筛选出灵敏度最好的组合的机率越大,但其工作量也将同步增加。因此,如何找到结构适宜的包被半抗原已

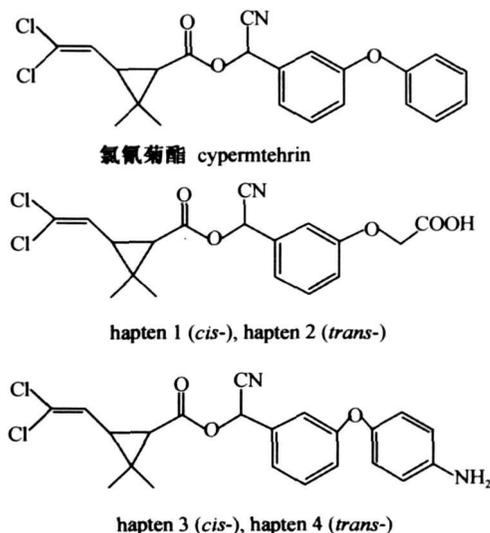


图1 氯氰菊酯及其优选半抗原的结构

Fig. 1 Structures of cypermethrin and its optimum selective haptens

成为菊酯类酶免疫分析的关键所在。

## 2 拟除虫菊酯类农药多残留酶免疫分析研究

通常有两种途径进行农药多残留免疫分析:一是针对不同类型农药,先分别制备相应的特异性抗体,然后将这些抗体一起使用,可同时检测多种农药<sup>[22]</sup>。二是针对一类农药按同系物结构的共性设计、合成通用半抗原,得到对一类(或其中几种)特定结构的化合物都具有识别和检测能力的通用抗体,即具有宽谱特异性(broad specificity)的抗体,这也是目前采用较多的方法。由于拟除虫菊酯类农药在结构上具有不同程度的共性,这为设计出适合多种农药的通用半抗原分子结构提供了有利的条件。

### 2.1 通用免疫半抗原设计

拟除虫菊酯类农药根据其化学结构不同可分为不含 $\alpha$ -氰基的I型和含 $\alpha$ -氰基的II型<sup>[12]</sup>。研究者们采用设计、合成通用免疫半抗原来制备宽谱特异性抗体,已建立了分别针对I型和II型的多残留ELISA方法<sup>[23-26]</sup>,所采用的通用免疫半抗原结构见表2。由表2可知, Miyake<sup>[23]</sup>和骆爱兰<sup>[26]</sup>等人采用的通用免疫半抗原的结构是许多菊酯类农药本身的部分结构,而 Watanabe<sup>[24]</sup>和 Mak<sup>[25]</sup>等人采用的则是在拟除虫菊酯的环丙烷部

位接上一个连接臂。Lee等<sup>[12]</sup>以间苯氧基苯甲酸(PBA)为免疫半抗原也获得了多克隆抗体, 用其建立的异源 ELISA 方法对有活性的手性溴氰菊

酯、氯氰菊酯和氯氟氰菊酯进行检测, IC<sub>50</sub>值分别为 4、4和 5 μg/L, 但未对该抗体进行菊酯类多残留 ELISA 方法的研究。

表 2 拟除虫菊酯多残留酶免疫分析法所用半抗原结构

Table 2 Structures of haptens used in multi-residual determination of pyrethroids

分析物 Analyte	通用免疫半抗原结构 General structure of immunizing antigen haptens	包被半抗原结构 Structure of coating antigen haptens	抗体 Antibody <sup>a</sup>	文献 Reference
I 型 Type I			M	Miyake 1998 <sup>[23]</sup>
I 型 Type I			P	Watanabe 2001 <sup>[24]</sup>
II 型 Type II			P	Mak 2005 <sup>[25]</sup>
I 型, II 型 Type I, Type II			P	Luo Ai-lan 骆爱兰 2005 <sup>[26]</sup>

注: <sup>a</sup>M 表示“单克隆抗体”; P 表示“多克隆抗体”。Note: <sup>a</sup>M denotes monoclonal antibody; P denotes polyclonal antibody.

值得注意的是, 为建立氟氰戊菊酯的 ELISA 方法, Nakata等<sup>[18]</sup>设计、合成了两种免疫半抗原(图 2)。采用半抗原 1 获得了氟氰戊菊酯的特异性单克隆抗体。他们原本希望通过半抗原 2 的合成制备出能识别具有苯氧基苄基结构的多种菊酯类农药, 但遗憾的是未能就此制备出相应的单克隆抗体。究其原因可能是因为所采用的连接臂刚性不足, 在其与蛋白质的偶联过程中发生了折叠。因此, 与单一农药 ELISA 的半抗原设计类似, 多残留 ELISA 检测中半抗原设计的连接臂也可能存在碳链不宜过长的特点。

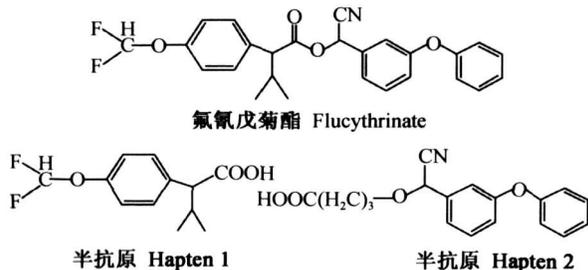


图 2 氟氰戊菊酯及其免疫半抗原结构

Fig 2 Structures of flucythrinate and its immunogen haptens

## 2.2 宽谱特异性抗体的筛选

基于单一菊酯类农药采用异源 ELISA 方法大都获得了较好的灵敏度, 在已报道的多残留 ELISA 方法中, 研究者也倾向于建立异源的 ELISA 方法。如 Watanabe<sup>[24]</sup>和 Mak等<sup>[25]</sup>设计了 8 种半抗原, 在使用通用免疫半抗原免疫大白兔获得多种兔血清(抗体)后, 分别建立了 25 个和 12 个抗体与包被抗原组合的间接竞争 ELISA 方法, 分别依据抗体对氯菊酯和氯氟氰菊酯的特异性来筛选抗体与包被抗原的组合(见表 2), 进而利用优选组合测定抗体对菊酯类农药的宽谱特异性。该筛选方法有利于发挥异源 ELISA 方法在菊酯类农药多残留酶免疫分析中的优势, 使抗体对农药的识别力增大, 从而降低了抗体对农药结构的要求, 为进一步提高抗体的宽谱特异性提供了条件。由于该筛选方法的筛选依据为抗体对单一农药的特异性, 因此单一农药的结构应具有足够的代表性, 否则, 所筛选出来的宽谱特异性抗体可能对不同农药的特异性差别较大。

## 2.3 抗体的宽谱特异性

采用常规的方法制备菊酯类农药宽谱特异性的单克隆抗体与多克隆抗体, 其抗体的宽谱特异性见表 3。已报道的菊酯类农药宽谱特异性抗体

具有较好的类别选择性 (class selective): M iyake<sup>[23]</sup>以菊酸 (CAA) 为半抗原制备的单克隆抗体, 能特征性地识别菊酯类农药的菊酸部分, 对 I 型菊酯类农药具有较好的特异性 ( $\mu\text{g/L}$  级), 表明 I 型菊酯类农药的菊酸部分是一个主要的抗原决定簇。W atanabe 等<sup>[24]</sup>以在 I 型菊酯的环丙基上连接一个饱和链烃连接臂作为半抗原, 获得了针对 I 型农药的宽谱特异性抗体; M ak 等<sup>[25]</sup>以在 II 型菊酯的环丙基上连接一个羧基作为半抗原, 获得了针对 II 型农药的宽谱特异性抗体, 表明免疫半抗原分子中羧基的有无是菊酯类农药宽谱特异性抗体类别选择性的关键因素。骆爱兰等<sup>[24]</sup>以 PBA 为半抗原获得的多克隆抗体虽然与 I 型和 II

型菊酯类农药均有交叉反应, 但其特异性较低 ( $\text{mg/L}$  级)。

尽管这些宽谱特异性抗体的类别选择性较好, 但其对同一类中不同种农药的抗体特异性差异却较大。如表 3 所示, M iyake 等<sup>[23]</sup>的宽谱特异性抗体对烯丙菊酯、生物烯丙菊酯、除虫菊素和胺菊酯的特异性高 ( $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{g/L}$ ), 而对苯醚菊酯、苜味菊酯和氯菊酯的特异性低, 且对 CAA 本身不能识别。这表明对于 I 型菊酯类农药, 除菊酸部分是主要的抗原决定簇外, 醇部分也是一个重要的抗原决定簇。而 W atanabe 等<sup>[24]</sup>的通用免疫半抗原同时具有菊酸和醇部分, M ak 等<sup>[25]</sup>的同时具有菊酸、醇和羧基部分, 但他们分别获得的针

表 3 宽谱特异性抗体与菊酯类农药的交叉反应<sup>a</sup>

Table 3 Cross reactivity of the broad specificity antibody for pyrethroids

分析物 Analyte	M iyake <sup>b</sup>		W atanabe <sup>b</sup>		M ak <sup>b</sup>		LUO Ai-lan 骆爱兰 <sup>b</sup>	
	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{g/L})$	交叉反应率 Cross-reactivity (%)						
I 型 菊酯类农药 Type I pyrethroid insecticide								
烯丙菊酯 allethrin	3.2	-	-	-	-	-	-	-
生物烯丙菊酯 bioallethrin	7.1	-	-	-	-	-	-	-
除虫菊素 pyrethrins	9.4	-	-	-	-	-	-	-
苯醚菊酯 phenethrin	91	136	NI	NI	-	-	-	-
氯菊酯 permethrin	1100	100	NI	NI	4.066	91.17	-	-
反-氯菊酯 trans-permethrin	-	25.9	NI	NI	-	-	-	-
顺-氯菊酯 cis-permethrin	-	142	NI	NI	-	-	-	-
苜味菊酯 resmethrin	96	10.9	NI	NI	-	-	-	-
生物苜味菊酯 bioresmethrin	-	25.3	NI	NI	-	-	-	-
胺菊酯 tetramethrin	2.8	-	-	-	-	-	-	-
联苯菊酯 bifenthrin	-	-	NI	NI	-	-	-	-
II 型 菊酯类农药 Type II pyrethroid insecticide								
甲氰菊酯 fenpropathrin	> 10000	-	-	-	4.232	87.59	-	-
氯氰菊酯 cypermethrin	6000	2.4	78.4	100	4.286	86.49	-	-
溴氰菊酯 deltamethrin	> 10000	NI	486	16.13	8.979	41.29	-	-
氯氟氰菊酯 cyhalothrin	> 10000	-	51	153.73	4.874	76.06	-	-
氟氯氰菊酯 cyfluthrin	1400	NI	30	261.33	-	-	-	-
氰戊菊酯 fenvalerate	-	NI	772	10.16	77.360	4.79	-	-
S-氰戊菊酯 esfenvalerate	-	NI	1086	7.22	-	-	-	-
其他氰戊菊酯异构体 other fenvalerate isomers	-	-	16~1011	7.75~490	-	-	-	-
氟胺氰戊菊酯 fluralinate	-	NI	50	156.8	-	-	-	-
氟胺氰菊酯 tau-fluralinate	> 10000	-	-	-	-	-	-	-
氟氰戊菊酯 flucythrinate	> 10000	-	-	-	-	-	-	-
菊酸 CAA	> 10000	-	-	-	-	-	-	-
间苯氧基苯甲酸 PBA	-	-	NI	NI	3.707	100	-	-

注: <sup>a</sup>-, 表示未进行交叉反应测定, NI 表示抑制率低 (< 10%); <sup>b</sup> 文献作者。

Note: <sup>a</sup>- Denotes not test cross-reactivity, NI denotes < 10% inhibition; <sup>b</sup> author of the literature cited.

对 I 型和 II 型的宽谱特异性抗体, 对同一类型中不同农药的抗体特异性差异也较大。分析这可能与他们所采用的宽谱特异性抗体筛选方法有关。

### 3 拟除虫菊酯类农药残留酶免疫分析方法的优化与应用研究

在获得特异性抗体的基础上进行方法的建立与优化, 是建立菊酯类农药 ELISA 方法所必须的过程。对菊酯类农药大都采用间接竞争的异源 ELISA 方法, 需要对抗原、抗体的反应体系进行优化, 如有机溶剂的筛选、pH 值和盐离子浓度的优化等。在已报道的菊酯类农药 ELISA 方法中, 大都选用甲醇为有机溶剂, 但不同免疫反应体系的甲醇含量不同。考虑到 pH 在 5.0~8.0 之间对菊酯类 ELISA 方法影响不大, 而盐离子浓度越多对抗原抗体反应的抑制越明显, 所以研究者常采用含适量甲醇、pH 7.4 的 PBS 体系作为优化的反应条件。

目前已经建立的菊酯类农药 ELISA 方法, 主要用于环境样品的农药残留检测, 也可用于农产品中农药的残留检测。如 Nakata 等<sup>[18]</sup> 分别对水样、土样、苹果和茶叶中氟氰戊菊酯进行添加回收率试验; Park 等人<sup>[27]</sup> 分别对白酒中的氯氰菊酯, 白酒、红酒、苹果、香蕉、黄瓜、生菜、洋葱和桃中的氯菊酯进行添加回收率试验, 都得到了较好的回收率。关于菊酯类农药多残留 ELISA 方法对水样中农药多残留的检测也有报道<sup>[24, 25]</sup>, 但添加浓度都在 1.0 mg/L 以上, 与实际应用的要求还有较大的差距。

### 4 讨论与展望

目前, 国内外相关研究主要集中在针对单一农药的特异性免疫检测方法的建立上, 而实际上农产品中的残留农药往往有多种共存现象, 单一农药组份的免疫分析技术通常难以满足实际检测的需要。因此, 发展农药多残留免疫检测技术是当前国内外农产品质量安全研究领域的前沿和发展趋势之一。

关于拟除虫菊酯类单一农药用 ELISA 方法检测的报道已较多, 而有关多残留的酶免疫分析方法近年来也受到关注。鉴于菊酯类农药的结构存在共性, 通用免疫半抗原设计和宽谱特异性抗体的制备仍将是建立菊酯类农药多残留酶免疫分析

方法的主流途径。以经验来设计通用免疫半抗原结构, 除已报道的通用半抗原外, 还可以采用以下几条思路: ①在拟除虫菊酯芳香族部位接上一个连接臂; ②将拟除虫菊酯苯氧基苄醇结构进行改造后作为半抗原; ③在对苯氧基苄醇结构进行改造的同时将菊酸结构改造, 仅保留 II 型菊酯类农药的氰基结构。近年来, “半抗原分子合理设计” 以及半抗原结构-抗体质量关系的 SAR 模型研究在农药免疫分析中得到了成功的应用<sup>[28, 29]</sup>。因此, 在拟除虫菊酯类农药通用免疫半抗原和竞争半抗原分子设计中引入 SAR 模型, 是提高制备宽谱特异性抗体成功率的手段之一。而且, 有关宽谱特异性抗体制备方法的新进展, 如 Wang 等人<sup>[30]</sup> 采用在载体蛋白上同时偶联多种农药半抗原的方法制备了人工免疫抗原, 免疫兔子后获得了能同时识别对应农药的宽谱特异性多克隆抗体。这也为今后研究菊酯类农药免疫测定方法提供了重要的研究思路。

菊酯类农药的空间构型比较复杂, 大都存在手性中心和顺反异构体, 且不同的异构体其生物活性差异很大。目前在已建立的菊酯类农药免疫方法中使用的半抗原多是其消旋体, 所获得的抗体对高效菊酯类农药的亲性和检测灵敏度均不够理想。因此, 合成出具有生物活性的拟除虫菊酯异构体的半抗原(或手性半抗原)并获得相应的抗体, 对于建立高效菊酯类农药的免疫分析方法, 也是值得探索的思路。

### 参考文献:

- [1] ZHANG Y+bin(张一宾). Recent Progress of World Pesticide (世界农药新进展) [M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2007.
- [2] XIE Tao(谢涛), XIONG Li(熊丽), WANG Kui(王奎), et al 拟除虫菊酯类杀虫剂对鱼类的毒性研究 [J]. Biology Teaching(生物学教学), 2005, 30(7): 47-49.
- [3] SHUN Ke-fang(孙克坊), ZHOU Qin(周勤), ZHOU Jin-qian(周金钱), et al 微量菊酯类农药对家蚕毒性的调查初报 [J]. Bulletin of Sericulture(蚕桑通报), 2002, 33(3): 27-29.
- [4] YANG Li-guo(杨利国), HU Shao-chang(胡少昶), WEI Ping-hua(魏平华), et al. Technology of Enzyme-linked Immunoassay (酶免疫测定技术) [M]. Nanjing(南京): Nanjing University Press(南京大学出版社), 1998: 242-263.
- [5] GAO Hong-bin(高宏斌), XU Ting(许艇), LI Ji(李季). 免疫分析方法在拟除虫菊酯类农药残留检测中的应用进展 [J]. J. Agro-environ Sci(农业环境科学学报), 2006, 25(Suppl): 425-428.

- [ 6 ] LU Ting-feng(刘廷凤), YANG Min-na(杨敏娜), LIU Ya-zi(刘亚子), et al 菊酯类农药酶联免疫吸附测定研究进展 [ J ]. Environmental Science and Technology (环境科学与技术), 2006, 29( 4 ): 100-102.
- [ 7 ] STANKER L H, BIGBEE C, EMON J V, et al An Immunoassay for Pyrethroids Detection of Permethrin in Meat [ J ]. J Agric Food Chem, 1989, 37, 834-839.
- [ 8 ] SKERRITT JH, HILL A S, MCADAM D P, et al Analysis of the Synthetic Pyrethroids Permethrin and 1(R)-Phenothrin, in Grain Using a Monoclonal Antibody-based Test [ J ]. J Agric Food Chem, 1992, 40 1287-1292.
- [ 9 ] SHAN G M, LEEMAN W R, STOUTAM RED W, et al Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Pyrethroid Permethrin [ J ]. J Agric Food Chem, 2000 48: 4032-4040.
- [ 10 ] WENGATZ, STOUTAM RED W, GEE S J et al Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of the Pyrethroid Insecticide Fenpropathrin [ J ]. J Agric Food Chem, 1998 46 2211-2221.
- [ 11 ] LEE H J, SHAN G M, AHN K C, et al Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Pyrethroid Cypermethrin [ J ]. J Agric Food Chem, 2004 52: 1039-1043.
- [ 12 ] LEE N, MCADAM D P, SKERRITT J H. Development of Immunoassays for Type II Synthetic Pyrethroids 1. Hapten Design and Application to Heterologous and Homologous Assays [ J ]. J Agric Food Chem, 1998 46: 520-534.
- [ 13 ] LEE N, BEASLEY H L, SKERRITT J H. Development of Immunoassays for Type II Synthetic Pyrethroids 2. Assay Specificity and Application to Water, Soil and Grain [ J ]. J Agric Food Chem, 1998 46 535-546.
- [ 14 ] 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.
- [ 15 ] 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.
- [ 16 ] GAO H B, LING Y, XU T, et al Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Pyrethroid Insecticide Cyhalothrin [ J ]. J Agric Food Chem, 2006, 54 5284-5291.
- [ 17 ] SHAN G M, STOUTAM RED W, WENGATZ J et al Development of an Immunoassay for the Pyrethroid Insecticide Esfenvalerate [ J ]. J Agric Food Chem, 1999, 47 2145-2155.
- [ 18 ] NAKATA M, FUKUSHIMA A, OHKAWA H. A Monoclonal Antibody-based ELISA for the Analysis of the Insecticide Flucythrinate in Environmental and Crop Samples [ J ]. Pest Manag Sci, 2001, 57 269-277.
- [ 19 ] 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.
- [ 20 ] ZHOU Si-xiang(周思祥), LIU Fu-cheng(刘福成). 农药人工抗原的合成研究进展 [ J ]. Pesticide (农药), 2005 44( 8 ): 337-341.
- [ 21 ] GOODROW M H, HARRISON R O, HAMMOCK B D. Hapten Synthesis Antibody Development and Competitive Inhibition Enzyme Immunoassay for S-Triazine Herbicide [ J ]. J Agric Food Chem, 1990 38: 990-996.
- [ 22 ] SKERRITT I H, HILLA S, BEASLEY H L, et al Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Quantitation of Organophosphate Pesticides Fenitrothion Chlorpyrifos methyl and Pirimiphos methyl in Wheat grain and Flour-milling Fractions [ J ]. J AOAC Int, 1992 75( 3 ): 519-527.
- [ 23 ] MIYAKE S, BEPPU R, YAMAGUCHI Y, et al Polyclonal and Monoclonal Antibodies Specific to the Chrysanthemic Acid Moiety of Pyrethroid Insecticides [ J ]. Pestic Sci, 1998, 54 189-194.
- [ 24 ] WATANABE T, SHAN G M, STOUTAM RED W, et al Development of a Class-specific Immunoassay for the Type I Pyrethroid Insecticides [ J ]. Analytica Chimica Acta, 2001, 444: 119-129.
- [ 25 ] MAK S K, SHAN G M, LEE H J et al Development of a Class Selective Immunoassay for the Type II Pyrethroid Insecticides [ J ]. Analytica Chimica Acta, 2005, 534: 109-120.
- [ 26 ] LUO Ai-lan(骆爱兰), YU Xiang-yang(余向阳), ZHANG Cun-zheng(张存政), et al 拟除虫菊酯类农药多残留酶免疫分析方法的建立 [ J ]. Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学), 2005 38(2): 308-312.
- [ 27 ] PARK E K, KIM J H, GEE S J et al Determination of Pyrethroid Residues in Agricultural Products by an Enzyme-linked Immunosorbent Assay [ J ]. J Agric Food Chem, 2004 52: 5572-5576.
- [ 28 ] LIU Y H, JIN M J, GUI W J et al Hapten Design and Indirect Competitive Immunoassay for Parathion Determination Correlation with Molecular Modeling and Principal Component Analysis [ J ]. Analytica Chimica Acta, 2007, 591: 173-182.
- [ 29 ] LIU Yi-hua(刘毅华), ZHU Guo-nian(朱国念), GUI Wen-jun(桂文君). 分子模拟在农药半抗原设计及其免疫识别机制中的应用 [ J ]. Chin J Pestic Sci(农药学报), 2007, 9(3): 201-208.
- [ 30 ] WANG S T, GUI W J, GUO Y R, et al Preparation of a Multiple-hapten Antigen and Broad Specificity Polyclonal Antibodies for a Multiple Pesticide Immunoassay [ J ]. Analytica Chimica Acta, 2007, 587: 287-292.

(Ed JIN SH)