

醚型菊酯类农药通用抗原的合成及鉴定

睢珂¹ 潘家荣^{* 1,2} 王磊 王志伟^{1,2,3} 赵杰¹
郑月明¹ 诸葛洁婧² 潘文斌²

¹(中国农业科学院农产品加工研究所 北京 100193)

²(中国计量学院生命科学学院 杭州 310018) ³(沈阳农业大学研究生部 沈阳 110866)

摘要 以 2-(4-乙氧基苯基)-2-甲基丙醇和氯乙酸钠为原料,合成了醚型菊酯类农药通用半抗原 Hapten I,经¹H-NMR 及¹³C-NMR 鉴定后,分别与牛血清蛋白(BSA)和卵清白蛋白(OVA)偶联,制得免疫原和包被原,经紫外光谱分析法计算得其偶联比分别为 14:1 和 35:1,说明人工抗原合成成功。免疫 Balb/c 小鼠制备多克隆抗体,效价达 1.28×10⁵,用半抗原经间接竞争 ELISA 检测人工抗原的免疫原性,IC₅₀ 和 IC₁₀ 值分别为 0.2653 和 0.0012 mg/L,证明人工抗原具有较好的免疫原性。交叉反应表明此多克隆抗体具有良好的特异性。

关键词 醚型菊酯类农药; 通用抗原; 酶联免疫吸附法

1 引言

拟除虫菊酯类(Pyrethroids)农药是 20 世纪 70 年代在天然除虫菊酯结构基础上发展起来的一类仿生杀虫剂,具有性质稳定、高效广谱等特点,但其残留期较长,抗性日趋严重,对水生生物高毒^[1]。醚型拟除虫菊酯新型菊酯类杀虫剂,具有触杀及胃毒活性,对光稳定,残效适中,对哺乳动物及鱼类低毒,是一类非常有前途的环境友好型农用杀虫剂^[2]。其最具有代表性的化合物有醚菊酯、氯醚菊酯、苜蓿醚、氟硅菊酯、三氟醚菊酯等,在防治农业害虫、除螨和趋避白蚁方面具有广阔的应用前景^[3]。随着其使用量和品种的不断增多,这类农药的残留和抗性问题也备受关注,探明这类农药在环境和生物体内的残留动态、代谢途径与代谢产物也十分重要。因此,研究痕量醚型菊酯类农药的检测方法具有重要意义。

目前,分析醚型菊酯类农药残留的方法主要有气相色谱-质谱法(GC-MS)^[4,5]、超高效液相色谱-质谱法(UPLC-MS)^[6,7]和凝胶渗透色谱法(GPC)等^[8]。尽管这些方法灵敏度高,但样品前处理过程繁琐,分析费用较高且费时,难以满足现场快速检测及大批量样品筛选的要求。酶联免疫吸附技术(ELISA)是将抗原抗体反应的高度特异性和酶的高效催化作用相结合的一种免疫分析方法^[9]。本方法灵敏度高、操作简便快速,不需昂贵的精密仪器设备,能较好地满足醚型菊酯类农药快速检测的需要。Shiro^[10]通过两种免疫原共制备得到针对醚菊酯的 2 种多克隆抗体和 3 种单克隆抗体,并研究了间接竞争 ELISA 检测方法; Katagiri 等^[11]对醚菊酯的 ELISA 检测中甲醇含量与反应温度进行了研究。本实验通过 2-(4-乙氧基苯基)-2-甲基丙醇与氯乙酸钠发生亲核取代反应,在产物中引入游离羧基及连接臂 Hapten I,继而偶联载体蛋白,制备出针对多种醚型拟除虫菊酯类农药的通用结构人工抗原和特异性抗体。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与实验对象

Stectrostin 400Hz 核磁共振仪(Bruker 公司); ZF-2 型三用紫外仪(上海安亭电子仪器厂); UV-1800 紫外分光光度计(日本岛津株式会社); MULTISKAN MK3 酶联免疫检测仪(美国 Thermo 公司)。

2-(4-乙氧基苯基)-2-甲基丙醇(东京化成工业株式会社); 氯乙酸钠、醚菊酯、氟硅菊酯(阿拉丁试剂公司); NaH、二环己基碳二亚胺(DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清白蛋白(OVA)、四甲基联苯胺(TMB)、弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FICA),均购自 Sigma 公司;

2011-11-14 收稿; 2012-02-08 接受

本文系“十一五”国家科技支撑计划项目(No.2009BAD9B03-Z04)资助

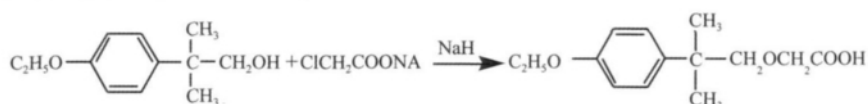
* E-mail: panjr@263.net

HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(北京索莱宝生物科技有限公司)。氯醚菊酯、苜蓿醚、硅醚菊酯、三氟醚菊酯、氯菊酯、甲氰菊酯、功夫菊酯、溴氰菊酯、氰戊菊酯(国家农药质量监督检验中心)。其余试剂均为分析纯,购自天津市瑞金特化学品有限公司。

雌性 Balb/c 鼠(SPF 级,动物号 SYXK 浙 2011-0157,4~6 周龄,杭州师范大学实验动物中心)。

2.2 半抗原合成及鉴定^[12]

称取 2 g 2-(4-乙氧基苯基)-2-甲基丙醇,溶于 20 mL 无水 DMF,于冰浴下分批加入 500 mg NaH,在室温下搅拌 3 h 至无气泡产生,加 600 mg 氯乙酸钠搅拌 15 min,转至 60 °C 油浴反应 6 h 后,再于室温搅拌反应 50 h。反应液倾入到 80 mL 蒸馏水中,用乙醚洗涤 3 次(80 mL/次),水相用 1 mol/L HCl 酸化至 pH 2 后,用乙醚萃取 3 次(80 mL/次),合并有机相,用蒸馏水和饱和食盐水分别洗涤 3 次(100 mL/次),无水 Na₂SO₄ 干燥后,旋转蒸发得到琥珀色的油状物,即为半抗原 Hapten I,产率为 36%。用薄层层析(TLC)监测反应进程,展开剂为石油醚-乙酸乙酯(5:1, V/V),产物结构用核磁鉴定。合成路线见图 1。



图解 1 Hapten I 的合成路线

Scheme 1 Synthetic route of Hapten I

2.3 人工抗原的制备与鉴定

以半抗原的羧基为活性位点,采用活化酯法使之分别与 BSA 和 OVA 偶联,制备免疫原和包被原。

2.3.1 活化酯法制备人工抗原 称取 0.05 mmol 半抗原,溶于 1 mL N,N-二甲基甲酰胺中,边搅拌边加入 15.5 mg DCC 和 9 mg NHS,室温下搅拌反应 6 h,以 10000 r/min 离心 10 min,此上清液为 A 液。称取 33.5 mg BSA(或 21.5 mg OVA),溶于 0.2 mol/L 硼酸盐缓冲液(pH 9.0),为 B 液。在磁力搅拌条件下,于 4 °C 缓慢滴加 A 液于 B 液中,磁力搅拌过夜。次日,将反应液于 PBS 缓冲液(pH 7.4)中 4 °C 透析 3 d,每天换液 3 次。透析液以 10000 r/min 离心 5 min,取上清液冷冻干燥^[12]。

2.3.2 人工抗原的鉴定 紫外扫描仪在 200~400 nm 波长对透析后样品进行扫描,鉴定偶联情况。根据各物质的最大吸收峰波长及吸光值,按照公式(1)计算偶联比(R_c)^[13]。

$$R_c = \frac{A_{Cdm} K_{Bbm} - A_{Cbm} K_{Bdm}}{A_{Cbm} K_{Ddm} - A_{Cdm} K_{Dbm}} \quad (1)$$

式中,下角标的 D, B 和 C 分别代表半抗原、BSA(或 OVA)和偶联产物;A 为吸光度值;K 为摩尔消光系数($K=A \times \text{分子量}/\text{浓度}$);dm 和 bm 分别为半抗原和 BSA(或 OVA)的最大吸收波长。

2.4 多克隆抗体的制备及效价鉴定

将免疫原的生理盐水溶液与弗氏完全佐剂等量混合,乳化完全后,背部皮下多点注射 6~8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠,免疫剂量为 50 mg/0.1 L。3 星期后,以弗氏不完全佐剂为乳化剂,以相同剂量和方法加强免疫小鼠。免疫过程每 3 周一次,共免疫 4 次。第 3 次免疫 10 d 后取小鼠尾血,采用间接非竞争 ELISA 测抗体效价^[14]。

2.5 抗体特异性测定

2.5.1 抗体对半抗原的抑制率 根据最佳抗原抗体工作浓度和优化条件,通过间接竞争 ELISA(icELISA)测定多克隆抗体对半抗原 Hapten I 的抑制率^[15]。将半抗原用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)配制成质量浓度分别为 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 50 和 100 mg/L 的标准溶液,绘制标准抑制曲线,计算抑制中浓度(IC₅₀)及检出限(IC₁₀)^[16,17]。

2.5.2 交叉反应 用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(CBS, pH 9.6)稀释包被原至最佳工作浓度,以 100 μL/孔包被 96 孔酶标板,4 °C 包被过夜,用含有 0.05% Tween-20 的 PBST 洗液洗板 3 次,拍干;每孔加入 200 μL 封闭液(5% 脱脂乳粉溶液),37 °C 封闭 2 h,洗板,拍干;将不同的醚型菊酯及 I, II 型拟除虫菊酯类农药用稀释液(含有 10% 甲醇、1% 脱脂乳粉及 0.05% EDTA 的 PBS 溶液)稀释成 0, 0.002, 0.02, 0.2, 2, 20, 100 和 200 g/L 的标准溶液,各浓度标准液分别与等量稀释 6.4×10⁴ 倍的抗体溶液混合后,放置

于 4 °C 反应 1 h ,100 μL/孔加入酶标板中 4 °C 反应 1 h 洗板拍干后 ,100 μL/孔加入酶标二抗稀释液 4 °C 反应 1 h 洗板拍干后加入底物溶液及显色液 ,显色完成后于 450 nm 读数^[19]。如 2.5.1 建立各种农药的标准抑制曲线 ,分别计算 IC₅₀ ,并按公式 (2) 计算交叉反应率 (CR)^[20] :

$$CR = \frac{IC_{50}(\text{Hapten I})}{IC_{50}(\text{YIHIIY})} \times 100\% \quad (2)$$

3 结果与分析

3.1 半抗原鉴定

对反应后薄层层析板进行监测 ,图 1A 为原料点板展开图 ,图 1B 为反应液点板展开图。可以看出 ,除未反应完的原料外 ,有极性明显增大且拖尾的斑点产生 ,即推断有带羧基的物质生成。产率较低 ,仅为 36% ,尚需对促进反应进行的条件及分离纯化条件进行研究。

由反应后纯化的产物的 ¹H-NMR 谱图 (图 2a) 可见 ,化学位移 δ: 11 (1H s ,COOH) ,7.35 ~ 6.90 (4H ,d ,C₆H₄) ,4.025 (2H s ,—OCH₂CO—) ,4.05 (2H ,q ,—CH₂O—) ,3.575 (2H ,s ,—CH₂OC—) ,1.45 (3H t ,CH₃) ,1.375 (6H s ,CH₃) ;由 ¹³C-NMR 谱图 (图 2b) ,175.64 (1C s ,—COOH—) ,157.12~114.11 (6C s ,—C₆H₄—) ,81.94 (1C s ,—CH₂O—) ,68.46 (1C s ,—OCH₂—) ,63.35 (1C s ,—CH₂O—) ,38.51 (1C s ,—C—) ,25.91 (2C s ,CH₃) ,14.89 (1C s ,CH₃) ,可以鉴定产物共有 14 个碳原子 ,符合产物的特征 ,成功引入了连接臂和羧酸基团。

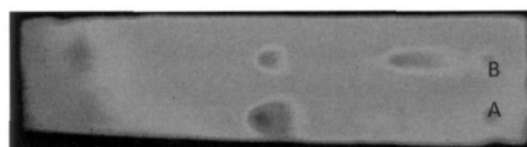


图 1 TLC 结果

Fig. 1 Result of TLC

A: 2-(4-乙氧基苯基)-2-甲基丙醇; B: 产物溶液。A: 2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropanol; B: product.

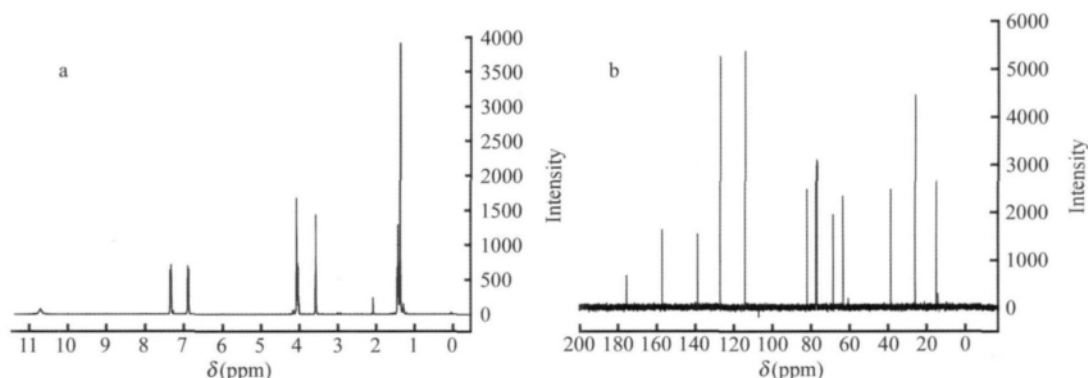


图 2 产物核磁氢谱 (a) 和碳谱 (b)

Fig. 2 ¹H-NMR spectrum (a) and ¹³C-NMR spectrum (b) of product

3.2 人工抗原鉴定

图 3 中为 Hapten I 分别与 BSA 和 OVA 偶联得到人工抗原的紫外图谱。Hapten I ,BSA 及偶联物 Hapten I -BSA 的最大吸收峰分别位于 275 ,278 和 276 nm ;偶联物的紫外吸收光谱区别于 Hapten I 和 BSA。由此可以推断偶联物的某些基团已经被半抗原修饰 ,同时也保留着载体蛋白的性质 ,半抗原已经成功偶联到载体蛋白上。按照这种方法推测 ,可以确定 Hapten I -OVA 中的半抗原也与相应的载体蛋白偶联成功^[11]。根据公式计算 ,Hapten I 与 BSA 及 OVA 的偶联比分别为 14:1 和 35:1 ,偶联效果良好。

3.3 抗体鉴定

通过间接非竞争 ELISA 测定免疫后小鼠所得到的抗血清的效价 ,达到 1.28×10⁵ ,并用棋盘法测得最佳工作条件 :抗原包被 1.0 mg/L ,抗体稀释 1.5×10⁴ 倍。在最佳条件下 ,以半抗原为研究对象 ,通过间接竞争 ELISA 获得回归方程 y = 0.1705x + 0.59826 (R² = 0.9922) ,IC₅₀ = 0.2653 mg/L ,IC₁₀ = 0.0012 mg/L ,表明抗体对半抗原有较强的亲和力。

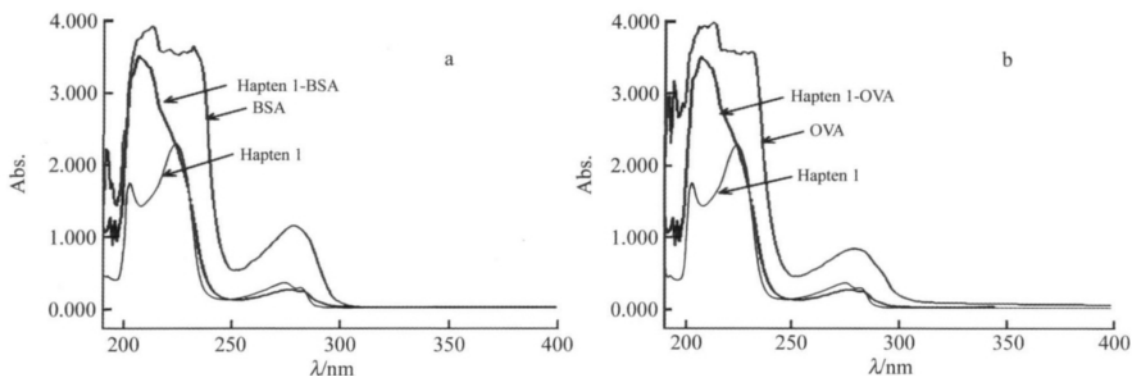


图 3 人工抗原紫外全波段扫描图

Fig. 3 UV spectra of artificial antigens

不同醚型菊酯及 I, II 型拟除虫菊酯类农药与抗体的交叉反应率列于表 1。由表 1 可见, 抗体可识别多种醚型菊酯类农药。其中, 抗体对醚菊酯、三氟醚菊酯、硅醚菊酯、氟硅菊酯、氯醚菊酯、苄螨醚等农药的交叉反应率高, 对氯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯、三氟氯氰菊酯、溴氰菊酯、氰戊菊酯等不能检出 (CR < 0.1%)。拟除虫菊酯类农药的结构见附表 (<http://www.analchem.cn/table/111096.pdf>) 比照该附表中不同农药的结构, 交叉反应率高的农药基本为醚型结构, 具有相同或相似的 2-(4-乙氧基苯基)-2-甲基丙醇结构基团, 推测其为一个重要的抗原决定簇。硅元素的取代对抗原决定簇的影响不大, 抗体对硅醚菊酯和氟硅菊酯的识别良好。苄螨醚和氯醚菊酯的结构中不存在乙氧基, 但也能够被识别, 推测其中苯环及其叔丁基结构可能是抗原决定簇重要的组成部分。虽然氟硅菊酯并非醚型结构, 其本身为烃链, 但对抗体有良好的响应, 也可作为 2-(4-乙氧基苯基)-2-甲基丙醇结构基团为抗原决定簇的佐证。

表 1 拟除虫菊酯类农药交叉反应率

Table 1 Cross-reactivities of pyrethroids

| 分析物 Analyte | 交叉反应率 Cross-reactivity (%) | 分析物 Analyte | 交叉反应率 Cross-reactivity (%) | 分析物 Analyte | 交叉反应率 Cross-reactivity (%) |
|------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| 醚菊酯 Ethofenprox | 91.02 | 硅醚菊酯 SSI-116 | 86.12 | 三氟醚菊酯 Flufenprox | 82.36 |
| 氟硅菊酯 Silafluofen | 78.54 | 氯醚菊酯 Chlorfenprox | 47.95 | 苄螨醚 Halfenprox | 34.90 |
| 氯菊酯 Permethrin | <0.1 | 甲氰菊酯 Fenpropathrin | <0.1 | 氯氰菊酯 Cypermethrin | <0.1 |
| 功夫菊酯 Cyhalothrin | <0.1 | 溴氰菊酯 Deltamethrin | <0.1 | 氰戊菊酯 Fenvalerate | <0.1 |

4 结论

本研究以 2-(4-乙氧基苯基)-2-甲基丙醇为起始物质, 通过亲核取代反应引入了游离羧基, 并且引入了 2 个碳原子长度的连接臂, 获得了 Hapten I。期望获得对多种醚型菊酯特异性强、选择性好的抗体。采用活化酯法合成免疫原和包被原, 结合比适宜, 动物免疫结果表明: 免疫原所免疫的小鼠效价在 10^4 以上, 对半抗原有良好的识别, 通过多种农药的交叉反应看出抗体能够识别具有特征结构的农药, 与其他拟除虫菊酯类农药基本不反应, 特异性好, 为进一步研制单克隆抗体和开发试剂盒做了必要的准备。

References

- LIU Shang-Zhong, WANG Min, CHEN Fu-Heng. *Chinese Journal of Pesticides*, **2004**, 43(7): 289 ~ 293
刘尚钟, 王敏, 陈馥衡. *农药*, **2004**, 43(7): 289 ~ 293
- GU Ke-Quan, CHEN Li, ZHANG Xiao-Qing. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, **1988**, 5(1): 71 ~ 73
顾可权, 陈力, 张晓清. *应用化学*, **1988**, 5(1): 71 ~ 73
- CONG Shan, SHEN De-Long, SUN Na-Bo, LIU Cheng-Dang. *Modern Agrochemicals*, **2007**, 6(1): 8 ~ 11
丛杉, 沈德隆, 孙娜波, 刘成荡. *现代农药*, **2007**, 6(1): 8 ~ 11
- SHAO Yan, ZHANG Li-Jun, ZHANG Zhan-En. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2011**, 39(11): 1753 ~ 1757
邵焰, 张丽君, 张占恩. *分析化学*, **2011**, 39(11): 1753 ~ 1757

- 5 LIN Zhu-Guang, JIN Zhen, LIU Yong, FAN Yu-Lan, TAN Jun, MA Yu, CHEN Mei-Yu, CHEN Zhao-Bin. *Chem. J. Chinese Universities*, **2005**, 26(12): 2218 ~ 2222
林竹光, 金珍, 刘勇, 范玉兰, 谭君, 马玉, 陈美瑜, 陈招斌. *高等学校化学学报*, **2005**, 26(12): 2218 ~ 2222
- 6 YANG Lin, WEN Yu-Yun, GONG Zhen-Bin. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2010**, 38(7): 968 ~ 972
杨琳, 温裕云, 弓振斌. *分析化学*, **2010**, 38(7): 968 ~ 972
- 7 JI Ran, ZHU Guang-Yan, LIU Bing. *Chinese Journal of Pesticide Science*, **2010**, 12(3): 283 ~ 288
纪然, 朱光艳, 刘冰. *农药学学报*, **2010**, 12(3): 283 ~ 288
- 8 Zhang W G, Wu P, Li C J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2006**, 20(10): 1563 ~ 1568
- 9 YANG Li-Guo, HU Shao-Chang, WEI Ping-Hua, GUO Ai-Zhen. *Enzyme Immunoassay Techniques*. Nanjing: NanJing University press, **1998**: 439 ~ 442
杨利国, 胡少昶, 魏平华, 郭爱珍. *酶免疫测定技术*. 南京: 南京大学出版社, **1998**: 439 ~ 442
- 10 Shiro M, Akiko H. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **1998**, 62(5): 1001 ~ 1004
- 11 Katagiri M, Kadoya T, Miyake K, Ishibashi F, Ohkawa H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1999**, 63(11): 1988 ~ 1990
- 12 Lilian A, Andrew B, Rhona C, Premji M, Garry P, Moejael S. *US. Patent*, WO2007/102771A1, **2007**
- 13 ZHAO Su-Qing, SUN Yuan-Ming, LE Xue-Yi. *Agrochemicals*, **2002**, 41(3): 9 ~ 11
赵肃清, 孙远明, 乐学义. *农药*, **2002**, 41(3): 9 ~ 11
- 14 LIU Xian-Jin, YAN Chun-Rong, LIU Yuan, YU Xiang-Yang, ZHANG Cun-Zheng. *Scientia Agricultura Sinica*, **2008**, 41(3): 727 ~ 733
刘贤进, 颜春荣, 刘媛, 余向阳, 张存政. *中国农业科学*, **2008**, 41(3): 727 ~ 733
- 15 DONG Jian, LIU Xian-Jin, HAN Zhao-Jun. *Jiangsu Journal of Agricultural Science*, **2001**, 41(3): 9 ~ 11
董健, 刘贤进, 韩召军. *江苏农业学报*, **2001**, 41(3): 9 ~ 11
- 16 Shiro M, Akiko H. *Pestic. Sci.*, **1997**(51): 49 ~ 55
- 17 WU Ya-Xin, XU Yuan-Yuan, PAN Jia-Rong. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, **2009**, 23(2): 341 ~ 344
吴雅欣, 许园园, 潘家荣. *核农学报*, **2009**, 23(2): 341 ~ 344
- 18 Shan G M, Donald W J. *Agric. Food Chem.*, **1999**, 47(5): 2145 ~ 2155
- 19 CHEN Jian-Xin. *Immunology in Plant Science Applications*. Beijing: China Agricultural University Press, **1998**: 56 ~ 58
陈建新. *免疫学技术在植物科学中的应用*. 北京: 中国农业大学出版社, **1998**: 56 ~ 58
- 20 LI Bo, SHI Hai-Yan, WANG Ming-Hua. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2008**, 36(1): 34 ~ 38
李波, 施海燕, 王鸣华. *分析化学*, **2008**, 36(1): 34 ~ 38

Synthesis and Identification of Generic Antigen for Ether Pyrethroid Pesticides

SUI Ke¹, PAN Jia-Rong^{*1,2}, WANG Lei¹, WANG Zhi-Wei^{1,2,3},
ZHAO Jie¹, ZHEN Yue-Ming¹, ZHUGE Jie-Jing², PAN Wen-Bin²

¹(Agro-food processing Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

²(College of life sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

³(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract 2-(4-Ethoxyphenyl)-2-methylpropanol can react with sodium chloroacetate by nucleophilic substitution reaction. Hapten I, as the product of the above reaction identified by ¹H-NMR and ¹³C-NMR, was conjugated to bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) by the active ester method to get artificial immune antigen and coating antigen, respectively. The binding ratio of artificial antigens was detected by UV spectroscopy as 14:1 and 35:1. Balb/c mice were immunized with immunogen to prepare antiserum whose titer reached 1.28×10⁵. The icELISA was conducted with the antiserum, and the IC₅₀ was 0.2653 mg/L and the IC₁₀ was 0.0012 mg/L.

Keywords Ether pyrethroid pesticides; Generic antigen; Enzyme-linked immunosorbent assay

(Received 14 November 2011; accepted 8 February 2012)