

## 论著

## 拟除虫菊酯类农药人工抗原的合成与鉴定

李莹莹<sup>1,2</sup>, 苗虹<sup>2</sup>, 骆鹏杰<sup>2</sup>, 匡华<sup>3</sup>, 赵云峰<sup>2</sup>, 吴永宁<sup>2</sup>(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100193; 2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所  
化学污染物监控室, 北京 100021; 3. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:**目的 合成拟除虫菊酯类农药人工抗原并对其进行鉴定。方法 采用功夫菊酸和3-间苯氧甲酸2种拟除虫菊酯类农药中间体,与四碳“间隔臂”—— $\gamma$ -氨基丁酸反应合成2种半抗原,经质谱鉴定合成成功。以牛血清蛋白为载体,采用活化酯法制备拟除虫菊酯的2种免疫原;以卵清蛋白为载体,采用混合酸酐法制备了3种包被原;经紫外光谱鉴定,粗略计算了偶联物最终浓度及结合比。结果 制备的免疫原免疫 Balb/c 小鼠后得到的小鼠多抗血清经 ELISA 检测效价达 1:50 000 以上,  $IC_{50}$  达 200 ng/ml。结论 拟除虫菊酯人工抗原的制备成功。

**关键词:**拟除虫菊酯;半抗原;免疫原;包被原;效价

中图分类号: S482.35 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2011)03-0200-05

## Synthesis and identification of artificial antigens for pyrethroids

Li Yingying, Miao Hong, Luo Pengjie, Kuang Hua, Zhao Yunfeng, Wu Yongning

( College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract: Objective** To synthesize and identify artificial antigens for pyrethroids. **Methods** Two haptens were synthesized by using Kung Fu chrysanthemic acid and 3-phenoxybenzoic acid as the intermediate of pyrethroids to react with a four carbon “spacer arm” ——aminobutyric acid, which were verified by MS. Immunogens for immunizing Balb/c mouse were prepared by the N-hydroxysuccinimide-activated ester method using bovine serum albumin as carriers; and coating antigens were prepared by mixed anhydride reaction using ovalbumin as carriers. The concentration of conjugates and molar ratios were estimated by UV spectrophotometry. **Results** The titer of polyclonal antisera determined by ELISA was high (>1: 50000) and the  $IC_{50}$  was 200 ng/ml. **Conclusion** The artificial antigens for pyrethroids were prepared successfully.

**Key words:** Pyrethroids; hapten; immunogen; coating antigen; titer

拟除虫菊酯类农药是一类重要的人工合成杀虫剂,具有高效、广谱及低毒的特点。随着该类药物的大量使用,各国也都开展了对该类药物的残留量测定<sup>[1]</sup>。多年来,仪器方法一直是检测拟除虫菊酯类农药残留量的主要方法,但其样品前处理过程复杂,检测过程中要耗费大量的有机溶剂,需要昂贵的仪器,检测成本高,不能进行现场快速监测或跟踪监控。而 ELISA 方法具有灵敏度高,特异性强,仪器设备要求低及样品前处理相对简单等优点,最突出的优点是适于现场监控和大量样本的筛选。

近年来,国内开展了许多拟除虫菊酯类农药免

疫分析方法的研究,李志茹<sup>[2]</sup>用间苯氧基苯甲酸为半抗原直接与载体偶联作免疫原制备了高效氯氟氰菊酯的抗体;朱国念等<sup>[3]</sup>制备了氰戊菊酯人工抗原、抗体;骆爱兰等<sup>[4]</sup>以间苯氧基苯甲酸为半抗原直接与牛血清蛋白偶联制备了针对4种拟除虫菊酯类农药的多克隆抗体;李波<sup>[5]</sup>制备了识别联苯菊酯及氯氟氰菊酯的多克隆抗体;郑伟华<sup>[6]</sup>对二溴菊酯进行结构改造制备多克隆抗体;尤海芹<sup>[7]</sup>制备了可以识别氰戊菊酯的多克隆抗体;韩爱华<sup>[8]</sup>制备了识别氯氟氰菊酯和氟氯苯菊酯的多克隆抗体;Gao等<sup>[9]</sup>制备了氟氯氰菊酯的多克隆抗体。国内开展的工作主要是通过免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体,制备的多克隆抗体灵敏度不是很高。

在本研究中,通过改造半抗原以获得灵敏度更高的单克隆抗体,分别采用了混合酸酐法和碳二亚胺法合成了拟除虫菊酯抗原。利用紫外可见分光光度法测定了偶联物分子间的结合摩尔比,对小鼠进行免疫,经 ELISA 测定效价达 1:50 000 以上,  $IC_{50}$

收稿日期:2010-12-08

基金项目:国家自然科学基金项目(30700664);国家高新技术研究发展计划(863计划-2007AA06Z404);中国博士后科学基金(20100470402)

作者简介:李莹莹 女 硕士生 研究方向为动物性食品卫生学  
E-mail: liyi198507@126.com

通信作者:吴永宁 男 研究员

达 200 ng/ml,为今后进行拟除虫菊酯的免疫分析方法奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

功夫菊酸为江南大学食品学院惠赠;3-间苯氧甲酸(PBA)购自 Alfa Aesar 中国天津分公司;牛血清白蛋白(BSA),鸡卵清白蛋白(OVA),氯甲酸异丁酯,N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC 盐酸盐), $\gamma$ -氨基丁酸均购于 Sigma 公司(St. Louis, MO, USA)。1,6-环氧二环,亚硫酸氯,吡啶,三丁胺,N,N-二甲基甲酰胺(DMF),三氯甲烷,正己烷,二氯甲烷等有机溶剂均为北京化工厂试剂。

### 1.2 实验动物

SPF 级雌性 Balb/c 小鼠购自维通利华实验动物中心,购买合格证号[SCXX(京)2006-0009];饲养于中国农业大学实验动物房,饲养许可证号[SYXK(京)2007-0022],饲养温度 20~26℃,湿度 40%~70%,饲喂小鼠全价颗粒饲料,试验方案经中国 CDC 营养与食品安全所实验动物伦理/管理委员会批准。

### 1.3 仪器

78-1 型磁力搅拌器(浙江乐清乐成电器厂);UV-190 紫外分光光度计(岛津);电子分析天平

(CoiC 公司);微量可调移液器(Eppendorf);SUNRISE 酶联检测仪(TECAN, USA, Inc.);液相色谱线性离子阱质谱仪(LTQ, Thermo, USA)。

### 1.4 拟除虫菊酯免疫原的人工合成

#### 1.4.1 拟除虫菊酯半抗原的合成

**酰氯的合成** 1.7 g 功夫菊酸或 1.5 g PBA 溶于 3 ml 三氯甲烷中,用磁力搅拌器小心搅拌,氮吹过程中分别加入 1  $\mu$ l 的 DMF 和 1 ml 亚硫酸氯,将加热温度设为 60℃,反应 1 h 后,加入正己烷 0.5 ml,然后用氮气吹干,重复 3 次该操作,最后剩余约 1.5 ml 左右的棕黄色的清亮油状液体即为酰氯<sup>[10]</sup>。

**间隔臂的连接** 称取 0.8 g 氨基丁酸,预先溶于 10 ml 2 mol/L KOH 溶液中,加入 3 ml 吡啶,于冰水浴中冷却。将上述制备所得到的酰氯于 20 min 内逐滴加入到氨基酸溶液中,然后剧烈搅拌 500 r/min,搅拌 60 min 停止反应。加入 1 ml 的 1 mol/L NaOH 溶液,再强力搅拌 400 r/min,反应进行 20 min 停止,用 6 mol/L HCl 进行酸化,pH 试纸测其 pH 大约在 6.0 即可。之后反应物与 10 ml 二氯甲烷液萃取,重复 2 次。合并萃取液(二氯甲烷层)与 20 ml 水进行分配,收集有机相,经装有约 5 g 无水硫酸钠的漏斗过滤,收集流出液进行旋蒸浓缩。浓缩液转移到具塞瓶中,于 4℃ 保存。功夫菊酸-GABA 和 PBA-GABA 的合成路线见图 1。

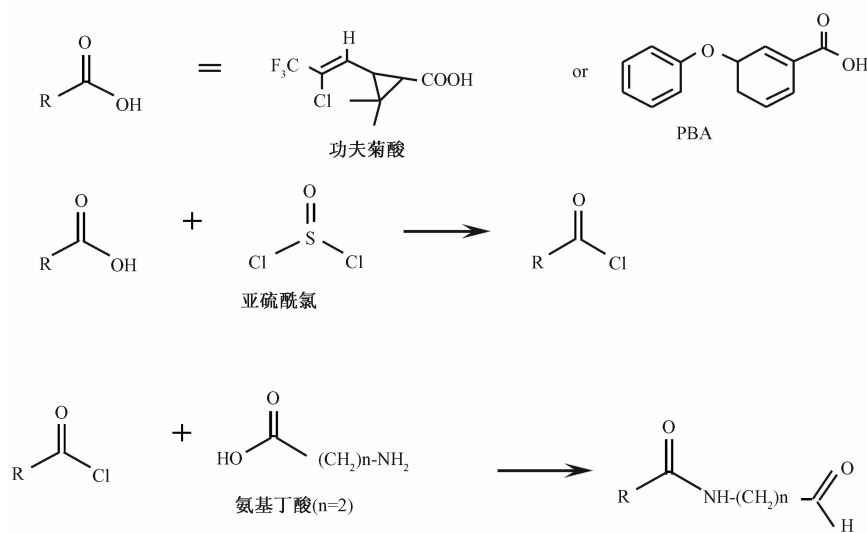


图 1 功夫菊酸/PBA-GABA 的合成路线图

Figure 1 Scheme of Kung Fu chrysanthemic acid/PBA-GABA synthesis

#### 1.4.2 功夫菊酸/PBA-GABA 与 BSA 偶联

采用 NHS 法将改造的半抗原与载体蛋白 BSA 偶联,偶联物作为免疫原。分别取 30  $\mu$ l 改造好的半抗原溶于 2 ml DMF 中,充分溶解后再加入 10 mg NHS 和 10 mg EDC 盐酸盐,室温避光搅拌过夜;搅

拌下,在 1 h 内将上述过夜活化的反应液逐滴加入到含 20 mg BSA 的 2 ml PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 中,室温搅拌 2 h。室温搅拌下,0.01 mol/L PBS 透析 48 h。得到 2 种免疫原即功夫菊酸-GABA-BSA 和 PBA-GABA-BSA。

### 1.4.3 功夫菊酸/PBA-GABA 及 PBA 与 OVA 的偶联

采用混合酸酐法制备包被原。分别把 30 μl 改造的半抗原液体或 10 mg PBA 原药溶于 0.5 ml 1,6-二氧六环中,加入 10 μl 三丁胺,放在冰水中冷却搅拌,再加入 5 μl 氯甲酸异丁酯,室温避光搅拌反应 60 min,得到混合酸酐溶液<sup>[11]</sup>。60 mg 的 OVA 溶于 6 ml PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)/1,6-二氧六环(5:1, V/V),充分溶解后,将上述混合酸酐溶液逐滴加入到 OVA 溶液中,用 1 mol/L NaOH 调 pH 为 7.5。室温反应 2 h。0.01 mol/L PBS 透析 48 h。得到 3 种包被原为功夫菊酸-GABA-OVA、PBA-GABA-OVA 和 PBA-OVA。

PBA 在紫外区能产生明显的吸收光谱。将透析好的偶联物溶液、PBA 溶液、载体蛋白溶液分别在 200 ~ 400 nm 下进行扫描,通过人工抗原与载体蛋白和半抗原的紫外扫描图谱及相应的最大吸收波长数据对比可定性证明人工抗原的合成是否成功。

将偶联物适当稀释后,测定其在 260 和 280 nm 时的分光光度值,按以下公式计算蛋白浓度:

$$\text{蛋白浓度 (mg/ml)} = 1.45OD_{280} - 0.74OD_{260}$$

功夫菊酸没有紫外吸收特性,蛋白浓度按理论值进行计算。

按照下面的公式计算偶联物中分子间的结合比<sup>[12]</sup>:

$$\text{结合比} = \frac{\sum \text{偶合物} - \sum \text{载体}}{\sum \text{半抗原}}$$

∑ 为半抗原、偶合物和载体蛋白三者 在 260 nm 处的摩尔吸收系数。

### 1.4.4 多抗血清的制备

将合成的 2 种免疫原免疫 10 只 8 周龄的 Balb/c 雌性小鼠。免疫原用 0.9% 的生理盐水溶解配制成 1 mg/ml 的溶液,再与等体积的弗氏完全佐剂进行乳化,乳化好后按 100 μg/只进行免疫,间隔 15 d 后以相同剂量抗原与弗氏不完全佐剂充分乳化后免疫。六免后眼眶采血,6 000 r/min 离心 10 min,收集血清放于 4 °C 保存。

### 1.4.5 多抗血清的检测

包被原功夫菊酸-GABA-OVA、PBA-GABA-OVA 及 PBA-OVA 用碳酸盐缓冲液 CB(0.05 mol/L, pH 9.6)进行适当稀释后包被酶标板,采用间接 ELISA 法进行多抗血清效价及抗原有效性试验。

## 2 结果

### 2.1 功夫菊酸-GABA 和 PBA-GABA 的质谱鉴定

取功夫菊酸-GABA 和 PBA-GABA 的粗品使用液相色谱-离子阱质谱(LTQ)进行质谱分析(电喷雾电离,负离子扫描模式),得到图 2 和图 3 所示的质谱图。图 2 中 3-PBA-GABA [M-1]<sup>-</sup> 准分子离子峰 m/z 297.7,主要碎片离子 [M-H<sub>2</sub>O] m/z 279.7, [M-COO]

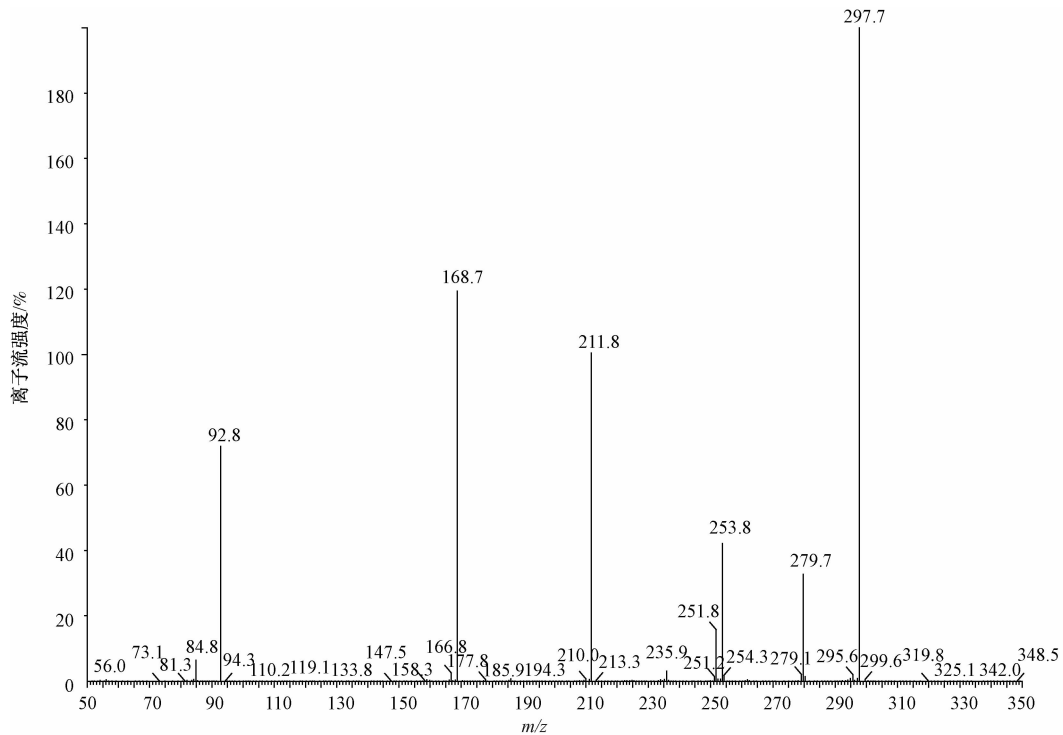


图 2 PBA-GABA 质谱图

Figure 2 Mass spectrum of PBA-GABA

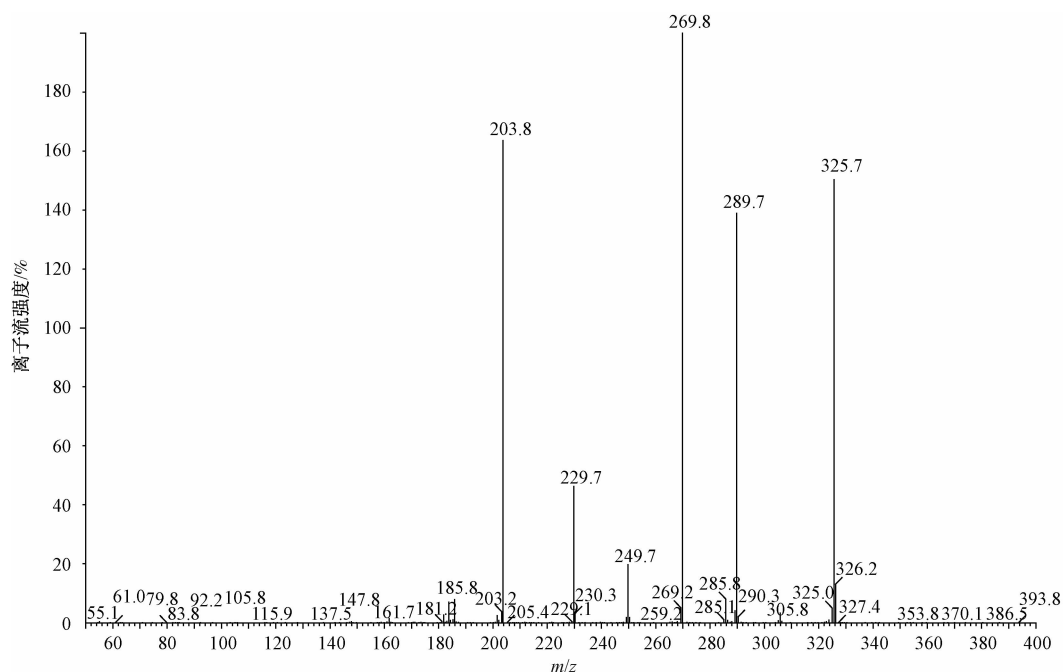


图3 功夫菊酸-GABA 质谱图

Figure 3 Mass spectrum of Kung Fu chrysanthemic acid-GABA

$m/z$  253.8,  $[M-(CH_2)_3COO]^-$   $m/z$  211.8。图3中功夫菊酸-GABA 准分子离子峰  $[M-1]^-$   $m/z$  325.7, 主要碎片离子  $[M-1-Cl]^-$   $m/z$  289.7,  $[M-1-HF]^-$   $m/z$  269.8。反应所得产物经鉴定分子量分别为 298.7 和 326.7, 与目标分子量 299 和 327 相同, 证明其结构改造是成功的。

## 2.2 紫外扫描分析

对偶联好的抗原进行紫外扫描分析, 见图4。从图4中PBA、BSA以及偶联物PBA-GABA-BSA的紫外吸收特征曲线可以看出, PBA在269 nm和

278 nm处有两个明显的吸收峰, BSA在279 nm处有最大吸收峰, PBA-GABA-BSA也有两个明显的吸收峰, 这两个吸收峰来源于PBA, 但与PBA相比明显后移, 原因是由于PBA-GABA与BSA偶联后, 碳链增长, 吸收波长增大, 因此吸收峰后移, 且吸收曲线形状与PBA和BSA相比发生了明显的变化, 证明偶联成功。同理对其他载体蛋白偶联物的吸收曲线分析可定性证明其偶联成功。通过公式近似计算得到3种偶联物浓度和分子结合摩尔比, 见表1。

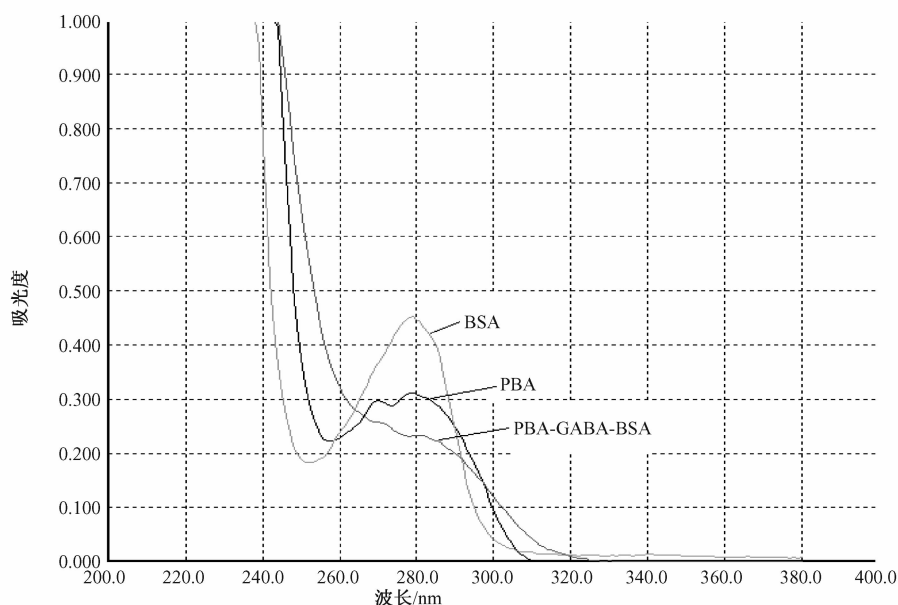


图4 BSA、PBA、PBA-GABA-BSA 的紫外分光光度计扫描图谱

Figure 4 Ultraviolet absorbance spectra of BSA, PBA and PBA-GABA-BSA

表1 偶联物浓度和分子结合摩尔比  
Table 1 The concentration of conjugates and the ratio of haptens and carrier proteins

偶联物	载体蛋白浓度 (mg/ml)	半抗原和载体 蛋白的结合比
PBA-GABA-BSA	6.7	12
PBA-OVA	5.1	13
PBA-GABA-OVA	8.2	18

### 2.3 多抗血清的制备和检测

以方阵法包被抗原,用间接 ELISA 法检测 10 只小鼠六免后的血清效价,检测结果表明 10 只小鼠都有效价,其中用免疫原为 PBA-GABA-BSA 免疫的小鼠血清效价都很高,达 1:50 000 (以 450 nm 处吸光度值大于 2 倍阴性对照孔的血清最高稀释倍数为抗体的 ELISA 效价)。将效价高的血清采用间接竞争 ELISA 方法进行抑制试验,6 只小鼠出现了阳性结果,其中 24 号小鼠血清效价及抑制效果最好,效价达 1:51 200,抑制达 200 ng/ml,对应的免疫原为 PBA-GABA-BSA,包被原为 PBA-OVA。该结果表明免疫小鼠产生了针对拟除虫菊酯的抗体,说明拟除虫菊酯人工抗原的合成是成功的。

### 3 讨论

PBA 化学名称为 3-间苯氧基苯甲酸,相对分子量为 214,功夫菊酸的相对分子量为 242,分子量都很小,小分子化合物(分子量低于 5 000),不具备免疫原性,不能直接刺激动物产生抗体<sup>[13]</sup>,只有与大分子量的载体蛋白偶联形成完全抗原才具有免疫原性,进入动物体内后才会产生抗体。一般来讲,在人工抗原合成中,免疫系统对位于载体远端的半抗原部分识别能力最强,所以连接一个间隔臂十分重要,使小分子与蛋白质之间有一定长度连接臂,才有利于产生针对半抗原的抗体<sup>[14]</sup>。本实验中,PBA 和功夫菊酸的结构都比较简单,很难通过单纯的连接蛋白产生高效特异的抗体,所以将其与氨基丁酸相连接,既延长了半抗原与载体蛋白之间的间隔臂,同时也增加了半抗原的灵活性,有助于产生较好的抗体。

异源蛋白作为半抗原载体可以引起动物机体产生强烈的免疫应答,常用的载体蛋白有 BSA、OVA、牛甲状腺球蛋白(BTG)、兔血清白蛋白(RSA)、人血清白蛋白(HSA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)等。因为 BSA 相对比较便宜,而且物理化学性质也相对比较稳定,在本实验中选择将半抗原与 BSA 偶联制备免疫原,而用 OVA 与半抗原的偶联物

作为包被原。试验中所改造的半抗原的末端仅有一个羧基,故采用混合酸酐法及碳化二亚胺法将半抗原与载体蛋白进行偶联。采用活化酯法成功制备了 2 种免疫原,采用混合酸酐法制备了 3 种检测用的包被原,目的是为了消除针对不同载体自身的识别效应。制备的免疫原经免疫 Balb/c 小鼠,产生了抗拟除虫菊酯的多抗血清,结果表明,合成的拟除虫菊酯人工抗原是成功的。本次试验的结果也将为下一步制备单克隆抗体奠定基础。

### 参考文献

- [1] APREA C, COLOSIO C, MAMMONE T, et al. Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods [J]. *J Chromatogr B: Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, 769 (2): 191-219.
- [2] 李志茹. 拟除虫菊酯类农药通用抗体制备及高效氯氟氰菊酯免疫检测技术研究[D]. 南京:南京农业大学, 2004.
- [3] 朱国念, 金仁耀, 程敬丽, 等. 氰戊菊酯人工抗原、抗体及其用途: 中国, 03114897. 2[P]. 2004-12-15.
- [4] 骆爱兰, 余向阳, 张存政, 等. 拟除虫菊酯类农药残留酶免疫分析方法的建立[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(2): 308-312.
- [5] 李波. 联苯菊酯和氯氟氰菊酯酶联免疫吸附测定法研究[D]. 南京:南京农业大学, 2007.
- [6] 郑伟华. 溴氰菊酯降解产物的免疫分析方法研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学, 2004.
- [7] 尤海芹. 氰戊菊酯免疫分析化学研究[D]. 扬州:扬州大学, 2005.
- [8] 韩爱华. 氯氟氰菊酯和氟氯苯菊酯免疫分析化学研究[D]. 扬州:扬州大学, 2007.
- [9] 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.
- [10] SHAN G, WENGATZ I, STOUTAMIRE D W, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of esfenvalerate metabolites in human urine [J]. *Chem Res Toxicol*, 1999, 12 (11): 1033-1041.
- [11] ANNE-LAURENCE Q, PATRICE N, JEAN P, et al. Hapten synthesis for a monoclonal antibody based ELISA for deltamethrin [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(4): 1670-1676.
- [12] ERLANGER B F, BOREK E, BEISER S M, et al. Steroid-protein 1. Preparation and characterization of bovine serum albumin in with testosterone and with cortisone [J]. *J Biol Chem*, 1957, 228: 713-227.
- [13] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2002:156-226.
- [14] JEANETTE M, VAN EMON, RALPH O, et al. Immunochemical methods for environmental analysis [M]. Washington, DC: American Chemical Society, 1990:112-139.