

丁草胺荧光偏振免疫分析——示踪物的合成与鉴定

薛 钢, 雷红涛, 沈玉栋, 刘细霞, 吴 青, 孙远明, 王 弘

(华南农业大学食品质量安全研究所/广东省食品质量安全重点实验室, 广州 510642)

摘要: 【目的】为建立除草剂丁草胺的荧光偏振免疫检测方法, 对关键试剂示踪物进行合成与鉴定。【方法】以异硫氰酸荧光素、乙二胺和己二胺为原料, 合成了异硫氰酸荧光素乙二胺(EDF)和异硫氰酸荧光素己二胺(HDF)两种中间体, 薄层层析法分离出目标产物, 电喷雾电离质谱法鉴定; 然后将 5-氨基荧光素(AF)、EDF、HDF 分别与丁草胺半抗原(BMPA)连接, 得到 3 种不同间隔臂的示踪物(BMPA-AF, BMPA-EDF 和 BMPA-HDF), 利用抗血清稀释曲线测定抗血清效价, 竞争抑制曲线测定不同示踪物检测灵敏度。【结果】3 种示踪物合成成功, 抗血清稀释曲线和竞争抑制曲线显示 3 种示踪物的抗血清效价分别为 1/600、1/1500 和 1/600, 半抑制浓度分别为 1 292、433 和 298 ng·ml⁻¹。【结论】合成出 3 种不同间隔臂的丁草胺示踪物, 对示踪物的性质进行初步研究, 为下一步建立丁草胺荧光偏振免疫分析方法奠定了基础。

关键词: 丁草胺; 荧光偏振免疫分析; 示踪物; 异硫氰酸荧光素

Development of Fluorescence Polarization Immunoassay for the Herbicide Butachlor—Synthesis and Identification of Tracers

XUE Gang, LEI Hong-tao, SHEN Yu-dong, LIU Xi-xia, WU Qing, SUN Yuan-ming, WANG Hong

(Institute of Food Quality and Safety, South China Agricultural University/Guangdong Key Lab of Food Quality and Safety, Guangzhou 510642)

Abstract: 【Objective】To establish fluorescence polarization immunoassay method (FPIA) for the herbicide butachlor, the key reagent (tracer) was synthesized and identified. 【Method】Using fluorescein isothiocyanate (FITC), ethylenediamine and hexylenediamine as materials, fluoresceinthiocarbamyl ethylenediamine (EDF) and fluoresceinthiocarbamyl hexylenediamine (HDF) were obtained, which were purified by thin layer chromatography and identified by ESI-MS. Various tracers (BMPA-AF, BMPA-EDF and BMPA-HDF) with different lengths of bridge between the hapten molecule and 5-Aminofluorescein (AF), EDF, HDF, were synthesized to achieve high-sensitivity FPIA. The titers of antiserum and the sensitivity of various tracers were estimated by dilution curves and calibration curves, respectively. 【Result】Three tracers were synthesized successfully, the titers of antiserum of three tracers were 1/600, 1/1500 and 1/600, and the IC₅₀s of butachlor FPIA of three tracers were 1292, 433 and 298 ng·ml⁻¹. 【Conclusion】The arm length of tracers affects effect the characters of FPIA, the tracer with longer arm is more sensitive to butachlor FPIA than one with shorter arm. This research is of benefit to further optimization of FPIA.

Key words: Butachlor; Fluorescence polarization immunoassay; Tracer; Fluoresceinthiocarbamyl

0 引言

【研究意义】丁草胺(butachlor)是一种高效的芽前选择性氯乙酰苯胺类除草剂, 化学名称为 2-氯-N-(2, 6-二乙基苯基)-N-(丁氧甲基)乙酰胺, 在中

国主要被用于去除水稻田中的杂草, 是生产和使用量最大的除草剂品种之一, 其残留危害已经引起人们关注^[1,2]。目前对丁草胺检测的方法主要是用气相色谱或液相色谱与质谱联用的方法^[3,4], 但由于仪器法前处理操作繁琐, 成本较高, 因此, 开发快速、低成本、操

收稿日期: 2007-11-01; 接受日期: 2007-12-17

基金项目: 国家自然科学基金(20377016, 30700663); 广东科技攻关项目(2007A020100006-10); 国家“863”计划现代农业技术项目(2006AA10Z447)

作者简介: 薛 钢(1983-), 男, 山西长治人, 硕士研究生, 研究方向为食品质量与安全。E-mail: xuegang_0929@163.com。通讯作者雷红涛(1973-), 男, 陕西渭南人, 副教授, 博士, 研究方向为农业与食品分析、食品质量与安全。Tel/Fax: 020-85288279; E-mail: hongtao@scau.edu.cn

作简单的分析方法具有重要的现实意义。【前人研究进展】免疫分析技术是一种以抗原-抗体间反应为基础的生物化学分析方法,利用抗原抗体间的高特异性和高亲和性,就可以达到从复杂组份中特异性识别待测物及满足检测高灵敏度的要求,其中酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)以其高效、低成本和高灵敏度的优势,应用最广^[5-8]。但是,ELISA作为一种非均相检测方法,每反应一步,就要分离一次反应结合物和未反应的游离试剂,而且需多步反应、洗涤,比较繁琐。因此,发展能够一步完成的均相法成为一种免疫检测的一种未来趋势^[9]。荧光偏振免疫分析方法(fluorescence polarization immunoassay, FPIA)作为一种更简便、快捷、无需分离洗涤操作的均相免疫检测方法,为高通量、自动化免疫检测展示了良好的应用前景。目前,农药、兽药和生物毒素等物质 FPIA 的研究甚少^[10-16],尚未见到除草剂丁草胺的 FPIA 研究报道。【本研究切入点】示踪物的结构是影响 FPIA 系统灵敏度的关键因素^[17-19]。不同结构的示踪物,尤其是不同间隔手臂的示踪物,可能对检测灵敏度会有一定差异。【拟解决的关键问题】本文设计 3 种不同间隔臂的示踪物,完成 3 种示踪物的合成、鉴定及初步性质鉴定,以期筛选出一种灵敏度较高的示踪物,为建立 FPIA 检测丁草胺奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验试剂与仪器

1.1.1 主要试剂 丁草胺(纯度 94.4%),山东滨州农药公司;异硫氰酸荧光素异构体 I (FITC isomer I)、5-氨基荧光素(5-Aminofluorescein, AF)、N,N'-二环己基碳二亚胺(N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)、乙二胺、己二胺均购于 Sigma 公司;其它化学试剂皆为市售分析纯;薄层层析硅胶 GF254,中国青岛海洋化工集团公司;丁草胺半抗原(BMPA)、丁草胺兔抗血清,笔者所在实验室自制。

1.1.2 主要仪器设备 Wallac VICTOR³1420 多标记分析仪,PE 公司;荧光微孔板,深圳金灿华实业有限公司;LCQ^{EDCA} 液质联用仪,美国 Finnigan 公司;U-3010 紫外可见光谱扫描仪,日本 Hitachi 公司;旋转蒸发器,北京 XZ-6 型。

1.2 试验方法

1.2.1 中间体异硫氰酸荧光素乙二胺(fluorescein-

thiocarbonyl ethylenediamine, EDF)和异硫氰酸荧光素己二胺(fluoresceinthiocarbonyl hexylenediamine, HDF)合成 用甲醇配制 1%的三乙胺溶液,分别将 20 mg (0.3 mmol) 乙二胺和 34.8 mg (0.3 mmol) 己二胺溶于 5 ml 甲醇三乙胺溶液中;再将 11.7 mg (0.03 mmol) FITC 溶于 1 ml 甲醇三乙胺溶液中,逐滴加到乙二胺和己二胺溶液中,室温避光搅拌反应 1 h,浓缩,硅胶柱层析(乙酸乙酯:甲醇=3:1, v:v),得到粉末状的 EDF 和 HDF,电喷雾离子化质谱(ESI-MS)鉴定后,备用。

1.2.2 BMPA-AF 示踪物合成 将 15.2 mg (40 μ mol) BMPA, 16.0 mg (80 μ mol) DCC 和 9.7 mg (80 μ mol) NHS 溶于 400 μ l 的 DMF 中,室温下搅拌反应过夜,离心去除沉淀后所得上清中加入 3.6 mg (10 μ mol) AF (5-氨基荧光素),室温下避光搅拌反应过夜,产物用薄层层析硅胶板分离三氯甲烷:甲醇=4:0.4 (v:v)作展开剂。将不同 R_f的产物用 1 ml 甲醇提取,所得提取物用于活性鉴定。

1.2.3 BMPA-EDF 和 BMPA-HDF 示踪物的合成 活泼酯反应步骤同 BMPA-AF 示踪物合成。将离心去除沉淀后的活泼酯反应产物分别加入 4.5 mg (10 μ mol) EDF 和 5 mg (10 μ mol) HDF,室温下避光搅拌反应过夜。反应液用薄层层析硅胶板分离,分别用二氯甲烷:甲醇=4:0.7 (v:v)和三氯甲烷:甲醇=4:0.4 (v:v)作展开剂。将不同 R_f的产物用 1 ml 甲醇提取,所得提取物用于活性鉴定。

1.2.4 示踪物活性的鉴定与浓度测定 分别测定游离示踪物,与 100 倍稀释抗血清结合后的荧光偏振(fluorescence polarization, FP)值,通过比较游离示踪物与结合特异性抗体后 FP 值的变化来鉴定示踪物活性。FP 值通过 Wallac VICTOR³1420 多标记分析仪,protocol 中默认的 FP-Fluorescein 480/535 这个程序进行测定。对于能够与抗体结合的示踪物,根据摩尔消光系数 $\epsilon=8.78 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,测定示踪物在 492 nm 下的吸光值(A),根据公式估算: $C_{\text{tracer}}=A/\epsilon L$ ^[20]。

1.2.5 抗血清稀释曲线建立 将 100 μ l 的示踪物(终浓度约 1 nmol·L⁻¹)加入到同等体积倍比稀释的丁草胺抗血清中(1/100、1/200、...、1/409600)中,静置 5 min 后,测量其 FP 值。

1.2.6 竞争抑制曲线的绘制 将 100 μ l 示踪物与 20 μ l 不同浓度的丁草胺标准品先后加入荧光微孔板孔中,再加入 100 μ l 一定浓度的丁草胺多抗,测读 FP 值。以 FP 为纵坐标,标准品浓度对数值为横坐标,

应用 OriginPro7.5 软件进行 4 参数对数拟合, 建立竞争抑制曲线^[21]。

2 结果与分析

2.1 EDF 和 HDF 质谱鉴定

ESI-MS: EDF $[M-H]^-$ 448.1 (95%), 448.0: $[M-H]^-MS^2$ 414.1 (100%), 404.1 (15%), 370.1 (25%), 346.2 (23%), 302.2 (72%); ESI-MS: HDF $[M+H]^+$ 505.0 (100%), 505.0: $[M+H]^+MS^2$ 487.3 (33%), 473.3 (40%), 460.3 (78%), 374.4 (85%)。分子离子峰及其碎片都能合理归属, 表明目标产物合成成功。

2.2 示踪物活性鉴定及浓度估测

取 TLC 纯化分离得到的示踪物, 浓度为 $1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 与 1/100 稀释的丁草胺抗血清结合。由于游离示踪物的 FP 值较小, 而与特异性的大分子物质结合以后, FP 值将变大, 所以用丁草胺的多克隆抗体和 FPIA 技术可以对合成的示踪物进行鉴定, 观察游离示踪物与结合抗体后的 FP 值的变化。结果图 1 所示, 可以看出对于合成的 3 种示踪物都有一条带在与抗体结合后 FP 值明显变大, 说明其能够与抗体结合, 它们在 TLC 板上的 R_f 值分别为 0.7、0.9 和 0.9, 3 种示踪物的结构如图 2 所示。分别测定 3 种示踪物在 492 nm 的吸光值, 估测其浓度, 结果 3 种示踪物的浓度分别为 890、7 400 和 4 700 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 抗血清稀释曲线建立

示踪物与抗血清的结合能力可以用抗血清的效价 (50%的示踪物与抗体结合时的稀释度) 来表示^[22]。3 种示踪物的抗血清稀释曲线如图 3 所示, 从图 3 中可以计算得到 3 种示踪物对应抗血清的效价分别为 1/600、1/1500 和 1/600。

2.4 竞争抑制曲线

根据丁草胺抗血清稀释曲线, 选择 70%结合时的抗血清稀释度为抗血清工作浓度^[23]。加入不同浓度的丁草胺标准品与示踪物竞争有限的抗体, 利用得到的 FP 值和标准品浓度的对数值作竞争抑制曲线如图 4 所示。3 种示踪物得到竞争抑制曲线的半抑制浓度分别

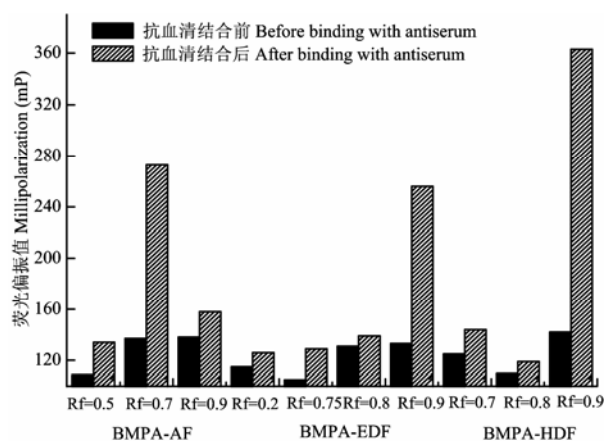


图 1 抗血清结合前后 3 种示踪物荧光偏振值

Fig. 1 Results of the three tracers binding with antiserum

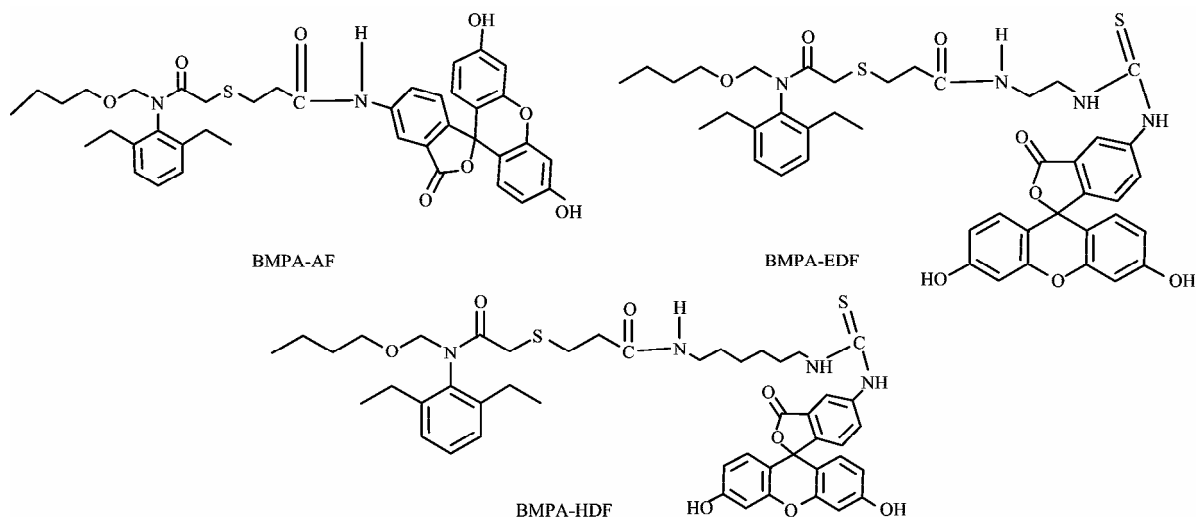


图 2 3 种示踪物的结构

Fig. 2 Structure of the three tracers

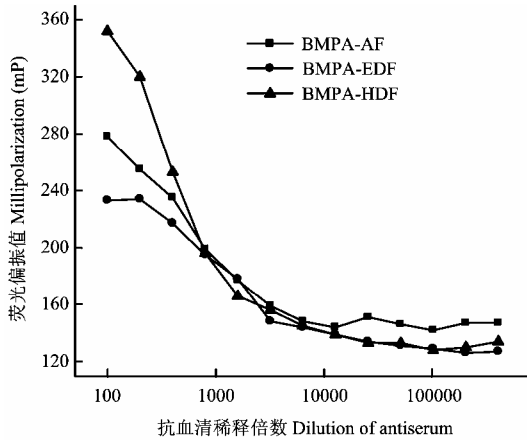
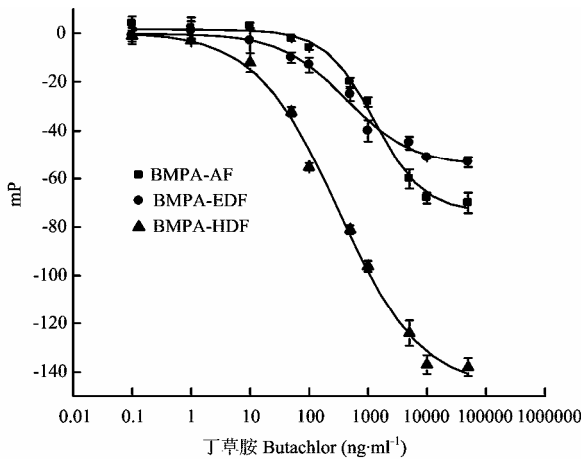


图 3 3 种示踪物抗血清稀释曲线

Fig. 3 Dilution curve of the three tracers



$\delta mP = mP - mP_0$ (mP 为加入不同浓度药物与示踪物竞争结合抗体后的 FP 值, mP_0 为不加药物时的 FP 值)
 $\delta mP = mP - mP_0$ (mP means FP signal with different butachlor concentration; mP_0 means FP signal without butachlor)

图 4 3 种示踪物竞争抑制曲线

Fig. 4 Calibration curve of the three tracers

为 1 292、433 和 316 $ng \cdot ml^{-1}$ 。

3 讨论

在竞争性免疫检测过程中, 抗体-示踪物与抗体-抗原间的亲和力应该相近, 才能使示踪物和抗原与抗体之间达到有效的竞争, 从而提高检测的灵敏度。若示踪物的合成方法与免疫抗原的合成方法相同或相似, 则示踪物化学结构比分析物结构更加类似于免疫半抗原结构, 这样往往所获抗体与示踪物的亲和力较强而与抗原的亲和力较弱, 这样就会造成示踪物的竞

争能力强, 获得的灵敏度较低^[24]。若需进一步提高检测的灵敏度, 从示踪物设计方面, 可以尝试合成与免疫原结构有差别的示踪物。本文所获得灵敏度已基本满足国家检测要求 ($MRL = 50 \mu g \cdot kg^{-1}$), 因此未再尝试其它结构的示踪物。

本文利用 AF, EDF 和 HDF, 与 BMPA 偶联合成 3 种不同“手臂”长度的示踪物, 利用这 3 种示踪物作了抗血清稀释曲线和竞争抑制曲线, 对它们的性质进行了初步的鉴定, 从信号响应强度方面看, 示踪物“手臂”间隔最长 (BMPA-HDF) 的响应强度最高, 几乎是另外两种的 2 倍; 从半抑制浓度来看, 有“手臂”的示踪物 BMPA-EDF 与 BMPA-HDF 半抑制浓度要远远低于无“手臂”的示踪物 BMPA-AF, 且“手臂”长的示踪物 BMPA-HDF 半抑制浓度最低。在 ELISA 中, 常用信号响应强度与半抑制浓度的比值来反映检测的灵敏度^[25], 本研究借用这一指标来衡量检测的灵敏度。可以发现“手臂”间隔最长的示踪物 (BMPA-HDF) 的灵敏度最高, 反之, “手臂”间隔最短 (BMPA-AF) 灵敏度最低。试验证明, 荧光素和抗原之间“手臂”的长短会对丁草胺 FPIA 的灵敏度产生影响。

4 结论

4.1 成功将 FITC 与乙二胺和己二胺连接, 在异硫氰酸根的位置上引入了两个不同长度的碳链, 并且引入一个氨基, 使其有利于与 BMPA 结合。

4.2 将 AF, EDF 和 HDF, 与 BMPA 偶联得到 3 种不同“手臂”长度的示踪物 BMPA-AF、BMPA-EDF 和 BMPA-HDF, 用 FPIA 技术进行了鉴定。对示踪物的性质作了初步鉴定, 3 种示踪物对应抗血清的效价分别为 1/600、1/1500 和 1/600, 竞争抑制曲线得到的半抑制浓度为 1 292、433 和 316 $ng \cdot ml^{-1}$ 。示踪物 (BMPA- EDF 和 BMPA-HDF) 的检测灵敏度能够达到检测水中丁草胺残留的要求。

References

[1] Yu Y L, Wu X M, Li S N, Fang H, Tan Y J, Yu J Q. Bioavailability of butachlor and myclobutanil residues in soil to earthworms. *Chemosphere*, 2005, 59(7): 961-967.
 [2] Hill A B, Jefferies P R, Quistad G B, Casida J E. Dialkylquinoneimine metabolites of chloroacetanilide herbicides induce sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 1997, 395(2-3):

- 159-171.
- [3] Namera A, Watanabe T, Yashiki M, Iwasaki Y, Kojima T. Simple analysis of arylamide herbicides in serum using headspace-solid phase microextraction and GC/MS. *Forensic Science International*, 1999, 103(3): 217-226.
- [4] Tanabe A, Mitobe H, Kawata K, Yasuhara A, Shibamoto T. Seasonal and spatial studies on pesticide residues in surface waters of the Shinano river in Japan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(8): 3847-3852.
- [5] Nogami T. Application of enzyme immunoassay for determination of pesticides and herbicides. *Mizu Kankyo Gakkaishi*, 1993, 16(10): 747-751.
- [6] Matuszczyk G, Knopp D, Niesser R. Development of an ELISA for 2, 4-D: characterization of two polyclonal antisera. *Journal of Analytical Chemistry*, 1996, 354(1): 41-47.
- [7] Yang J Y, Wu Q, Wang H, Pan K, Lei H T, Hu D Y, Shen Y D, Xiao Z L, Zheng X F, Sun Y M. Production and identification of high affinity monoclonal antibodies against pesticide carbofuran. *Agricultural Sciences in China*, 2007, 6(9): 1082-1088.
- [8] Liang C Z, Jin R Y, Gui W J, Zhu G N. Enzyme-linked immunosorbent assay based on a monoclonal antibody for the detection of the insecticide triazophos: Assay optimization and application to environmental samples. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(19): 6783-6788.
- [9] Eremin S A, Smith D S. Fluorescence polarization immunoassay for pesticides. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 2003, 6(3): 79-99.
- [10] Eremin S A, Ryabova I A, Yakovleva J N, Yazynina E V, Zherdev A V, Dzantiev B B. Development of a rapid, specific fluorescence polarization immunoassay for the herbicide chlorsulfuron. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 468(2): 229-236.
- [11] Krasnova A I, Ruzhova V V, Burkin A A, Eremin S A. Rapid determination of propanil by fluorescence polarization immunoassay. *Agrokimiya*, 2001, (4): 76-80.
- [12] Choi M J, Lee J R, Eremin S A. Development of single reagent for fluorescence polarization immunoassay of atrazine. *Food and Agricultural Immunology*, 2002, 14(2): 107-120.
- [13] Wang Z H, Zhang S X, Shen J Z, Eremin S A. Development of fluorescence polarization immunoassay for determination of pesticides and veterinary drugs. *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi*, 2007, 27(11): 2299-2306.
- [14] Eremin S A, Murtazina N R, Ermolenko D N, Zherdev A V, Mart'ianov A A, Yazynina E V, Michura I V, Formanovsky A A, Dzantiev B B. Production of polyclonal antibodies and development of fluorescence polarization immunoassay for sulfanilamide. *Analytical Letters*, 2005, 38(6): 951-969.
- [15] Shim W B, Kolosova A Y, Kim Y J, Yang Z Y, Park S J, Eremin S A, Lee I S, Chung Duck-Hwa. Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of ochratoxin A. *Journal of Food Science and Technology*, 2004, 39 (8): 829-837.
- [16] Boglione-Kerrien C, Furet Y, Bachellier J, Paintaud G, Autret-Leca E. Methadone blood assay by the FPIA technique: application to the monitoring of patients in maintenance treatment to opiates. *Annales de Biologie Clinique*, 2007, 65(1): 51-57.
- [17] Deryabina M A, Yakovleva Yu N, Popova V A, Eremin S A. Determination of the herbicide acetochlor by fluorescence polarization immunoassay. *Journal of Analytical Chemistry*, 2005, 60 (1): 80-85.
- [18] Yakovleva J N, Zeravik J. Hapten design and development of polarization fluoroimmunoassay for Nonylphenol. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2003, 83(7-8): 597-607.
- [19] Krikunova V S, Eremin S A, Smith D S, Landon J. Preliminary screening method for dioxin contamination using polarization fluoroimmunoassay for chlorinated phenoxyacid pesticides. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2003, 83(7): 585-595.
- [20] Kolosova A Y, Park J H, Eremin S A, Kang Sung-Jo, Chung Duck-Hwa. Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of the organophosphorus pesticide parathion-methyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(5): 1107-1114.
- [21] Wang Z H, Zhang S X, Nesterenko I S, Eremin S A, Shen J Z. Monoclonal antibody-based fluorescence polarization immunoassay for sulfamethoxypyridazine and sulfachloropyridazine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(17): 6871-6878.
- [22] Krasnova A I, Eremin S A, Natangelo M, Tavazzi S, Benfenati E. A polarization fluorescence immunoassay for the herbicide propanil. *Analytical Letters*, 2001, 34(13): 2285-2301.
- [23] Onnerfjord P, Eremin S, Emneus J, Marko-Varga G. Fluorescence polarization for immunoreagent characterization. *Journal of Immunological Methods*, 1998, 213(1): 31-39.
- [24] Yakovleva J N, Lobanova A Y, Shutaleva E A, Kourkina M A, Mart'ianov A A, Zherdev A V, Dzantiev B B, Eremin S A. Express detection of nonylphenol in water samples by fluorescence polarization immunoassay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378(3): 634-641.
- [25] Manclus J J, Montoya A. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for the insecticide chlorpyrifos. 2. Assay optimization and application to environmental waters. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1996, 44(12): 4063-4070.