

· 研究论文 ·

毒死蜱多克隆抗体的制备

桂文君, 金仁耀, 黄雅丽, 朱国念*

(浙江大学 农药与环境毒理研究所, 浙江 杭州 310029)

摘要:以三氯硫磷为起始原料,经三步反应合成得到毒死蜱半抗原 O-乙基 O-(3, 5, 6三氯-2吡啶基)N-(3羧丙基)硫逐磷酸胺(简称 CHBu),此半抗原分别与牛血清蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)用碳二亚胺法和混合酸酐法通过偶联反应得到免疫抗原和包被抗原,其结合比分别为 14.6 和 6.2。用所得的免疫原免疫兔子获得了高效价(抗血清: 2.56×10^4 ; 冻干粉: 2.56×10^6)、高亲和性、特异性好的多克隆抗体。交叉反应试验表明,该抗体与毒死蜱各结构类似物交叉反应率均小于 4%;亲和性试验表明,在 1~500 ng/mL 浓度范围内,抑制率与浓度呈线性关系,线性回归方程为 $y = 23.503 \lg(x) + 28.556$, $r = 0.9919$,抑制中浓度 $I_{50} = 8.2$ ng/mL,最低检测限为 1.0 ng/mL。

关键词:毒死蜱;半抗原;多克隆抗体

中图分类号: R392.11

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2006)02-0109-06

Preparation of Polyclonal Antibody for Insecticide Chlorpyrifos

GUI Wen-jun, JIN Ren-yao, HUANG Ya-li, ZHU Guo-nian*

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

Abstract: The hapten for the insecticides chlorpyrifos [O, O-diethyl O-(3, 5, 6-trichloropyridin-2-yl) phosphorothioate] was prepared starting from PSC₃ via three steps. Then, the hapten was conjugated to bovine serum albumin (BSA) with CD method and ovalbumin (OVA) with mixed anhydride method to form the immuno-antigens and the coating antigen, respectively. The conjugation ratio was 14.6 and 6.2 for the hapten-BSA conjugate and the hapten-OVA conjugate. The polyclonal antibody (PAb) was obtained with high titer (2.56×10^4 for antiserum and 2.56×10^6 for purified antibody) after immunizing to rabbits. The specificity studies showed that the cross-reactivities were all less than 4%, which indicated that the immunoassay was quite specific for chlorpyrifos. The affinity studies showed that the real detection limit of the ELISA, for standards, was 1.0 ng/mL with an I_{50} value of 8.2 ng/mL. The linear regression equation for the assay was described as follow: $y = 23.503 \lg(x) + 28.556$ ($r = 0.9919$), with the linear ranging from 1 to 500 ng/mL.

Key words: chlorpyrifos; hapten; polyclonal antibody

收稿日期: 2005-10-12; 修回日期: 2006-02-14.

作者简介: 桂文君(1973-),男,浙江桐庐人,博士研究生,主要从事农药残留和免疫化学分析研究; *通讯作者: 朱国念(1957-),男,浙江诸暨人,博士,教授,博士生导师. 联系电话: 0571-86430193; E-mail: zhugn@zju.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(30370944)部分内容.

毒死蜱 [chlorpyrifos, O, O-二乙基-O-(3, 5, 6-三氯-2吡啶基)硫逐磷酸酯] 是一种在世界范围内广泛应用的高效杀虫剂, 可用于粮食、蔬菜、水果及经济作物的害虫防治^[1]。它对哺乳动物毒性中等, 但对非靶标水生生物毒性较高^[2, 3]。其在粮食、环境样品等方面的残留问题已日益受到人们的重视^[4-7]。目前, 有关毒死蜱残留量的分析多采用气相色谱法^[6, 7]。由于常规仪器分析方法不适用于批量样品的筛选检测或现场检测任务, 而酶联免疫法 (ELISA) 因其具有快速、方便、廉价等优点, 受到人们越来越多的关注。迄今为止, 国内外已有用酶联免疫吸附测定法检测毒死蜱残留的报道^[8-11]。制备毒死蜱半抗原时, 一般可从毒死蜱分子的两个部位进行结构修饰 (见图 1)。

朱国念等^[10]采用 3-巯基丙酸与毒死蜱反应得到第一种类型的半抗原; Mancus 等^[8]采用 5 步反应路线合成出了第二种类型的半抗原 (结构见图 2)。

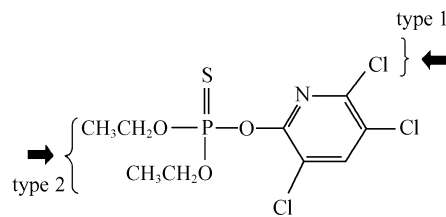


Fig. 1 Molecular structure of chlorpyrifos

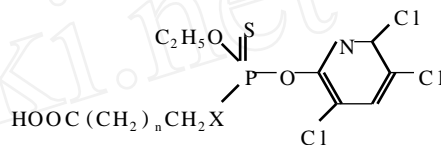
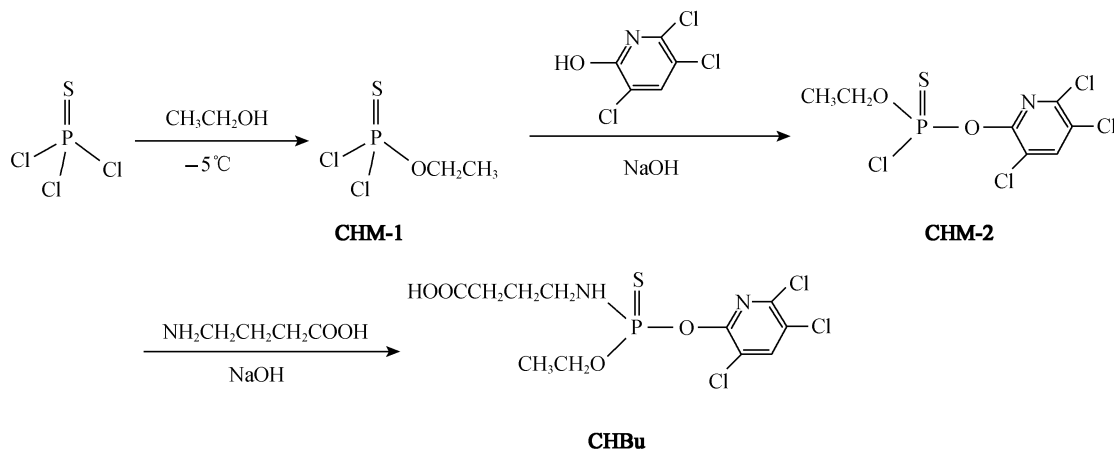


Fig. 2 Molecular structures of chlorpyrifos haptens
X = O, N; n = 2, 3, 5

作者在前人研究的基础上, 选用简化的合成路线, 从毒死蜱乙氧基位入手, 以三氯硫磷为起始原料, 合成了第二种类型的毒死蜱半抗原, 免疫动物后制备出了高效价、高亲和性、特异性好的抗毒死蜱多克隆抗体。

半抗原的合成路线如下:



1 材料与方 法

1.1 药品与试剂

三氯硫磷 (杭州农药厂); 三氯吡啶酚 (pyrchlor, 纯度 97%, 浙江新农化工有限公司); 4-氨基丁酸 (上海试剂三厂); 毒死蜱 (chlorpyrifos) 及其结构类似物标样 (Bayer 公司); 卵清蛋白 (OVA, MW 45 000, 华美生物工程公司); 辣根过氧化物酶 (HRP, 华美生物工程公司); 邻苯二胺 (OPD, 中国五联化工厂); 牛血清蛋白 (BSA, MW 67 000)、二环己基碳二亚胺 (DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 均为 Sigma 公司产品; 弗氏完全、弗氏不

完全佐剂 (北京生物制品研究所); N, N-二甲基甲酰胺 (DMF)、正三丁胺、氯甲酸乙酯等 (均为市售分析纯); 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 7.4, 0.01、0.02、0.10 mol/L, 自配); 碳酸盐缓冲溶液 (CBS, pH 9.5, 0.01、0.05 mol/L, 自配); 洗涤液 (PBST, pH 7.4, 0.01 mol/L, 自配); 醋酸缓冲溶液 (pH 4.0, 0.06 mol/L, 自配)。

实验动物为新西兰杂交大白兔 (浙江省中医学 院动物实验中心)。

1.2 实验仪器

质谱仪 (Esquire-LC00075, Bruker 公司); 核磁共振仪 (AVANCE DMX 500, Bruker 公司); 分光

光度计 (UV 7504pc型,上海欣茂仪器公司);酶标仪 (550型, Bio-Rad公司);高压灭菌锅 (VERTICAL STERILIZER TSAO HSN TH-3560)。

1.3 毒死蜥人工抗原的合成与鉴定

1.3.1 O-乙基硫代磷酰二氯 (CHM-1)的合成 按文献 [12, 13]报道的方法进行。其中三氯硫磷的投料量为 68 g (约 0.4 mol),反应得到 51.8 g 无色透明液体 (收率 72.3%,以三氯硫磷计)。

1.3.2 O-乙基 O-[3, 5, 6-三氯-2-吡啶基]N-(3-羧丙基)硫代磷酸胺 (CHBu)的合成^[14-16] 称取 18.8 g (约 0.05 mol) CHM-1,搅拌下加入 9.9 g (约 0.05 mol) 2-(3, 5, 6-三氯)吡啶酚、15 mL 三正丁胺 (TEA)和 80 mL 二氯甲烷。待固体全部溶解后,冰水浴冷却至 20 以下,滴加 2 mol/L 的氢氧化钠水溶液 55 mL,继续反应 1 h。用 50 mL 质量分数为 5%的氢氧化钠水溶液 (预冷至 0~5) 洗涤,油层用 0~5 的水洗涤至中性,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,得少量棕色油状物。用石油醚 (2 ×50 mL)提取,减压浓缩,得黄色液状 O-乙基 O-[3, 5, 6-三氯-2-吡啶基]硫代磷酰氯 (CHM-2) 8.35 g (收率 40.9%,以三氯吡啶酚计)。

将 1.03 g (约 10 mmol) 4-氨基丁酸溶解于 10 mL 1 mol/L 的氢氧化钠溶液中,冰水浴冷却至 10 以下,搅拌下缓慢加入 3.41 g (约 10 mmol)溶解于 10 mL 二氧六环的 CHM-2溶液,滴加 10 mL 1 mol/L 的氢氧化钠水溶液,保温反应 2 h。加入 50 mL 质量分数为 5%的氢氧化钠水溶液 (预冷至 0~5),用石油醚洗涤 (2 ×40 mL),弃油层,以 2 mol/L 的盐酸调节水相 pH 约为 3,再以乙酸乙酯萃取 (2 ×40 mL),提取液用少量水洗涤后经无水硫酸钠干燥,减压浓缩,残余物于 4 下密封存放过夜,有无色晶体析出。以乙酸乙酯-石油醚 (1:1, 体积比)重结晶,过滤,干燥,得 1.33 g 白色固体 (CHBu) (收率 32.6%,以 CHM-2计)。ESI-MS, m/z (%): 407 (100%), [M+1]⁺; 409 (94%), [M+2+1]⁺; 429 (50%), [M+23]⁺; 431 (45%), [M+2+23]⁺。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.85 (s, 1H, ArH), 4.38~4.30 (m, 2H, CH₂O), 3.54 (s, 1H, NH), 3.25~3.24 (m, 2H, NCH₂), 2.53~2.49 (t, 2H, OOCCH₂), 1.94~1.87 (m, 2H, CH₂), 1.42~1.39 (t, 3H, CH₃)。

1.3.3 毒死蜥半抗原与 BSA 偶联物的制备 将 0.2 mmol 半抗原溶解在 1 mL DMF 中,加入 0.6 mmol NHS,搅拌反应 15 min 后加入 0.3 mmol

DCC,室温下搅拌反应过夜。4 000 r/min 离心 10 min,取上清液 300 μL 缓慢滴加到 6 mL 溶有 120 mg BSA 的 CBS 缓冲溶液 (0.01 mol/L)中,搅拌反应 4 h。待反应完成后,装入透析袋,先用蒸馏水透析 3 次,再用 PBS (0.01 mol/L)透析 3 d,每天换透析液 3~4 次。取出分装, -20 下保存。

1.3.4 毒死蜥包被抗原的合成 取 0.25 mmol 毒死蜥半抗原溶于 1 mL DMF 中,搅拌下加入 60 μL 三丁胺和 30 μL 氯甲酸乙酯,室温下搅拌反应 1 h。取反应液 300 μL 缓慢滴加到 6 mL 溶有 120 mg OVA 的 CBS 缓冲溶液 (0.01 mol/L)中,室温搅拌反应 2 h 后,装入透析袋,先用蒸馏水透析 3 次,再用 0.01 mol/L 的 PBS 透析 3 d,每天换透析液 3~4 次。取出分装, -20 下保存。

1.4 人工抗原结合比的测定

按合成毒死蜥免疫抗原和包被抗原反应所用半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例,用紫外分光光度计^[17]扫描测定,按 (1)式计算偶联物的结合比。

$$\frac{C_a}{C_b} = \frac{AC_{am} \cdot KB_{bm} - AC_{bm} \cdot KB_{am}}{AC_{bm} \cdot KA_{am} - AC_{am} \cdot KA_{bm}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: C_a/C_b——偶联物中 A、B 两种物质摩尔浓度比 (结合比); AC_{am}, AC_{bm}——偶联物分别在 A、B 最大吸收波长下的吸光值; KA_{am}, KB_{bm}——A、B 在各自最大吸收波长下的摩尔消光系数; KA_{bm}——A 在 B 最大吸收峰波长处的摩尔消光系数; KB_{am}——B 在 A 最大吸收峰波长处的摩尔消光系数。

1.6 抗体的制备与纯化

以偶联物 CHBu-BSA 为免疫抗原对大白兔进行免疫。先进行基础免疫,免疫剂量为每千克兔子用 1.0 mg 免疫抗原。免疫抗原用生理盐水稀释,加等体积弗氏完全佐剂充分乳化,注射时采用背部皮下 5 点注射法。3 周后加强免疫,免疫剂量为基础免疫的 1.5 倍,改用弗氏不完全佐剂,每两周加强免疫 1 次。从第 2 次加强免疫开始,免疫后第 8~10 d 耳静脉取血,采用间接竞争 ELISA 法测定抗血清的效价。效价稳定后,心脏采取全血,分离抗血清,并采用辛酸-硫酸铵二步沉淀法纯化抗体,制成冻干粉,于 -20 下保存备用。

1.7 酶标抗体的制备

按郭春祥等人^[18]的方法制备毒死蜥抗体-

HRP结合物,抗体与HRP的质量比为1:1。

1.8 抗体免疫活性的测定

1.8.1 毒死蜱抗体效价 利用间接ELISA法测定经免疫获得的抗血清和冻干粉的效价。

1.8.2 工作浓度 采用方阵试验法测定包被抗原和酶标抗体稀释度,确定直接竞争ELISA法抗原和酶标抗体最适工作浓度。 OD_{490} 值约为1.0,抗体抗原用的浓度组合即为抗体抗原的工作浓度。

1.8.3 抗体亲合性和特异性 采用三氯吡啶酚、甲基毒死蜱、三唑磷、对硫磷、丙溴磷、二嗪磷进行竞争性抑制试验。抗体抗原浓度根据1.8.2的测定方法确定。步骤如下:用0.05 mol/L pH 9.6的碳酸盐缓冲液将包被抗原稀释后包被96孔酶标板,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育2 h, PBST洗涤3次;用质量分数为2.0%的脱脂奶封闭,每孔200 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育0.5 h后洗涤3次;加入系列浓度的各种农药标准溶液50 μ L,再加入经PBS缓冲液稀释的酶标抗体50 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育1 h, PBST洗涤3次;加入底物溶液,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育15 min;加入2 mol/L的硫酸50 μ L终止反应。酶标仪测定 OD_{490} 值,绘制免疫反应抑制率 X_1 [由(1)式计算得]和农药浓度半对数曲线图,求出抑

制反应50%所需的浓度(I_{50}),由(2)式计算交叉反应率(X_2)。

$$X_1 (\%) = \frac{(OD_{max} - OD_{min}) - (OD_x - OD_{min})}{(OD_{max} - OD_{min})} \times 100 \quad (1)$$

$$X_2 (\%) = \frac{\text{毒死蜱 } I_{50}}{\text{毒死蜱或其结构类似物 } I_{50}} \times 100 \quad (2)$$

式中: OD_{max} ——不加农药时的吸光值;
 OD_x ——毒死蜱或其结构类似物浓度为x时的吸光值;
 OD_{min} ——空白对照的吸光值。

2 结果与分析

2.1 人工抗原结合比的测定

从紫外扫描图(图2)看,半抗原在291 nm处有最大吸收峰;半抗原与BSA、OVA的偶联物分别在287和284 nm处出现最大吸收峰,与载体蛋白的最大吸收峰(BSA:278 nm;OVA:279 nm)相比,发生了明显的变化,表明半抗原与载体蛋白成功地发生了偶联。经计算,半抗原与BSA的结合比为14.6:1,与OVA的结合比为6.2:1。

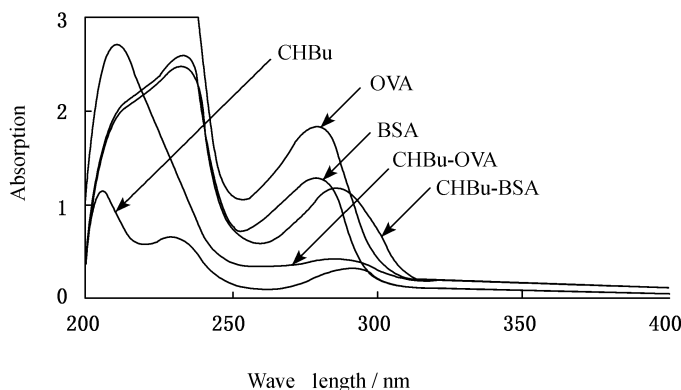


Fig 2 UV absorption spectrum of chlopyrifos artificial antigen

2.3 毒死蜱抗体效价及工作浓度

用间接ELISA法测定经免疫获得的抗血清和冻干粉的效价,抗血清的效价为 2.56×10^4 ,冻干粉的效价为 2.56×10^6 。经方阵试验法测定包被抗原和抗体稀释度,确定直接竞争ELISA法中抗原和抗体的最适工作浓度分别为抗原2.0 μ g/mL、酶标抗体4.0 μ g/mL。

2.4 抗体亲合性与检测灵敏度

亲合性测定结果表明,在一定的浓度范围内,抑制率与浓度呈线性关系,线性回归方程为 $y = 23.503 \lg(x) + 28.556$, $r = 0.9919$, $I_{50} = 8.2$ ng/mL。按标准曲线计算,最低检测限 $I_{20} = 0.4$ ng/mL,但实际有效抑制率范围为31%~90%,对应的毒死蜱标样工作浓度范围(即线性范

围)为 1~500 ng/mL。由毒死蜥抑制率反应曲线(见图 3)可知,在低浓度时,标准曲线有轻微的镰刀现象。

2.5 抗体的特异性

用直接竞争 ELISA 法检测毒死蜥、毒死蜥结构类似物对获得的多克隆抗体的抑制结果显示,当对毒死蜥抗体的抑制率为 50%时,毒死蜥的浓度为 8.2 ng/mL,抗体对各类似物的交叉反应率均小于 5% (甲基毒死蜥除外),结果见表 1,由此可知该抗体的特异性较好。

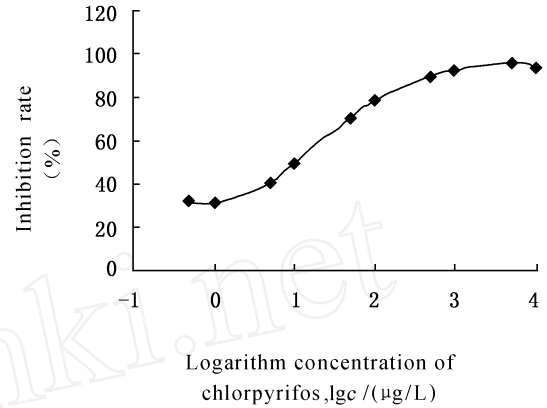


Fig. 3 Inhibition reaction curve

Table 1 Recognition of several compounds by anti-CHB u-B SA antibodies with direct ELISA format

Compd.	Structure	I ₅₀ / (ng/mL)	Cross-reactivity (%)
Chlopyrifos		8.2	100
Chlopyrifos methyl		8.6	95.35
Sodium salt of Trichloropyridinol		3 565	0.23
Triazophos		1 350	0.61
Parathion		1 280	0.64
Profenofos		229	3.58
Diazinon		> 82 000	< 0.01

3 讨论

采用简化的合成路线,从毒死蜥分子的乙氧

基位着手,经 3 步反应成功地合成了具有显著抗原决定簇特征结构的毒死蜥半抗原,经质谱和核磁共振氢谱鉴定,产物为预期目标化合物。另外,

Cho等^[14]报道合成毒死蜱半抗原需要在无水条件下进行,而本合成路线是在有水介质中进行的,操作更方便。

获得的高效价多克隆抗体,特异性高,与毒死蜱结构类似物及毒死蜱的代谢产物的交叉反应率均低于5% (甲基毒死蜱除外)。直接竞争ELISA法抑制率试验结果表明,与朱国念^[10]、吴刚^[11]等由毒死蜱分子 氯原子位得到的半抗原(简称AR)制备得到的多克隆抗体(对毒死蜱的 I_{50} 为275 ng/mL, I_{90} 为4.2 ng/mL)相比,本方法制备的毒死蜱多克隆抗体对毒死蜱的 $I_{50} = 8.2$ ng/mL, $I_{91} = 1.0$ ng/mL,达到Manclus等^[8]人制备的单克隆抗体水平。相对于毒死蜱AR半抗原分子,CHBu半抗原分子与载体蛋白偶联后,其抗原决定簇更具有毒死蜱分子结构特征,因而能获得更好的免疫效果。

本方法获得的毒死蜱多克隆抗体与甲基毒死蜱的交叉反应率较高(95.35%),这可能是由于毒死蜱与甲基毒死蜱的相对分子质量和分子结构十分相似之故。因目前甲基毒死蜱一般作为卫生杀虫剂而与毒死蜱分开使用,所以并不影响该抗体用于对环境和农作物样品中毒死蜱残留的快速测定。

参考文献:

- [1] LIU Qian-kai (刘乾开), ZHU Guo-nian (朱国念). New Application Manual of Pesticides (新编农药使用手册) [M]. Shanghai (上海): Shanghai Science and Technology Press (上海科学技术出版社), 1999. 60-62.
- [2] Tafuri J, Roberts J. Organophosphate poisoning [J]. Annals of Emergency Medicine, 1987, 16(2): 193-202.
- [3] Ward S, Arthington A H, Pusey B J. The effects of a chronic application of chlorpyrifos on the macro-invertebrate fauna in an outdoor artificial stream systems: Species responses [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1995, 30: 2-23.
- [4] Hallberg G R. Pesticide pollution of groundwater in the humid United States [J]. Agriculture Ecosystems and Environment, 1989, 26: 299-367.
- [5] Neidert E, Troman R B, Saschenbrecker P W. Levels and incidences of pesticide residues in selected agricultural food commodities available in Canada [J]. J AOAC Int, 1994, 77: 18-33.
- [6] SHILi-li (石利利), LIN Yu-suo (林玉锁), XU Yi-gang (徐亦钢), et al 高尔夫球场土壤和水中毒死蜱农药残留的测定 [J]. Rural Eco-Environment (农村生态环境), 2000, 16(3): 35-38.
- [7] WANG Jun (汪军). GC-MS定性定量分析出口西兰花样品中毒死蜱的农药残留量 [J]. Modern Agrochemicals (现代农业), 2002, 1(1): 23-24.
- [8] Manclus J J, Primo J, Montoya A. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for the insecticide chlorpyrifos 1. Monoclonal antibody production and immunoassay design [J]. J Agric Food Chem, 1996, 44: 4052-4062.
- [9] Manclus J J, Primo J, Montoya A. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for the insecticide chlorpyrifos 2. Assay optimization and application to environmental waters [J]. J Agric Food Chem, 1996, 44: 4063-4070.
- [10] ZHU Guo-nian (朱国念), WU Gang (吴刚), WU Hui-ming (吴慧明). 有机磷杀虫剂毒死蜱人工抗原的合成与鉴定 [J]. Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学), 2003, 36(6): 657-662.
- [11] WU Gang (吴刚), HUANG Ya-li (黄雅丽), ZHU Guo-nian (朱国念), et al 有机磷杀虫剂毒死蜱的免疫化学分析方法研究 [J]. Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学), 2004, 37(3): 382-386.
- [12] PENG Pan-ying (彭盘英), JIANG Cai-yun (蒋彩云), WANG Yu-ping (王玉萍). O-乙基硫代磷酸二氯合成反应的动力学参数测定及条件选择 [J]. Chin J Appl Chem (应用化学), 2001, 18(3): 257-258.
- [13] LI Zai-guo (李在国). Preparation of Organic Intermediates (Second edited) (有机中间体制备, 第二版) [M]. Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2001. 218-224.
- [14] Cho Y A, Lee H S, Park E Y. Development of an ELISA for the organophosphorus insecticide chlorpyrifos [J] Bull Korea Chem Soc, 2002, 23: 481-487.
- [15] CHEN Ru-yu (陈茹玉), YANG Hua-zheng (杨华铮), ZENG Qiang (曾强), et al O-烷基 O-芳基 N-烷基硫代磷酸酰胺类化合物的合成及其结构与除草活性定量关系的研究 [J]. Acta Chimica Sinica (化学学报), 1981, 39(7): 643-651.
- [16] JIA Ming-hong (贾明宏), QIAN Chuan-fan (钱传范), HAN Li-jun (韩丽君), et al 甲基对硫磷人工抗原的合成与鉴定 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2003, 5(2): 22-23.
- [17] YANG Li-guo (杨利国), HU Shao-chang (胡少昶), WEI Hua-ping (魏平华), et al Technique of Enzyme Immunoassays (酶免疫测定技术) [M]. Nanjing (南京): Nanjing University Press (南京大学出版社), 1998. 279-281.
- [18] GUO Chun-xiang (郭春祥), GUO Xi-qiong (郭锡琼). 介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法 [J]. Shanghai J Immunology (上海免疫学杂志), 1983, 3(2): 97-100.

(Ed. JIN S H)