

杀虫剂西维因特异性多克隆抗体的制备及鉴定

许 艇, 李 季, 李兴海

(中国农业大学资源与环境学院生态系, 北京 100094)

摘 要: 采用室内实验方法, 合成了保留有西维因分子结构特性的半抗原——6-(1-萘氧基甲酰胺)-己酸, 将其与 BSA 偶联后免疫两只兔, 获得了特异性的西维因多克隆抗体。对抗体进行纯化及鉴定, 在优化条件下, 用间接酶联免疫吸附分析(ELISA)法检测了西维因的浓度, 西维因的最低检测限达 $14 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词: 西维因; 多克隆抗体; 酶联免疫吸附分析

中图分类号: S482.34 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2003)06-0758-04

Preparation and Identification of Polyclonal Antibodies of Insecticide Carbaryl

XU Ting, LI Ji, LI Xing-hai

(Department of Ecology, China Agriculture University, Beijing 100094, China)

Abstract: Hapten 6-(1-naphthoxy) carbonyl amino hexanoic acid that preserves the molecule structure character of carbaryl was synthesized. Polyclonal antibodies for carbaryl were obtained by immunizing two rabbits with synthesized antigen that utilized carbaryl as a hapten conjugated with bovine serum albumin (BSA). These antibodies were purified and identified and optimized in our lab. Under an excellent condition, the minimum detection limit of indirect ELISA for carbaryl was $14 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Keywords: carbaryl; polyclonal antibody; ELISA

西维因是世界上最早商品化的一种氨基甲酸酯类杀虫剂, 它对昆虫具有触杀和胃毒作用, 广泛应用于蔬菜、果树等农作物的害虫防治, 图 1 为西维因化学结构式。虽然西维因对人畜低毒, 但对蜜蜂的毒性很大^[1], 如果人体长期与西维因接触, 可引起亚慢性神经中毒^[2]。西维因的广泛使用, 已对食品、水果、水源和土壤造成了污染^[3]。

西维因传统的仪器检测方法包括气相色谱(GC)和高效液相色谱(HPLC)^[4,5]。但是, 这些检测方法的样品前处理过程均非常复杂, 并且西维因在处理过程中易转变成 α -萘酚, 检测结果不稳定。目前, 较为先进的小分子物质检测法是酶联免疫吸附分析(ELISA), 由于它具有快速、特异性强、灵敏度高等优点, 已被国内外学者广泛应用于农药残留的检测。本实验旨在制备一种特异性的西维因多克隆抗体, 为探索今后的西维因 ELISA 检测打下坚实的基础。

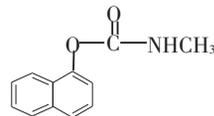


图 1 西维因化学结构式

Figure 1 Chemical structure of carbaryl

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

1.1.1 材料和试剂

96 孔酶标板, 福建厦门; 纤维素 DE-52, What-man; α -萘酚, 北京益利精细化工厂; 6-氨基己酸、三正丁胺, 北京化学试剂公司; N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、氯甲酸异丁酯, Sigma 公司; N, N'-二环己基碳二亚胺(DCC), 上海松江茶花胶粘剂厂; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂, GibcoBRL 公司; HRP 标记羊抗兔二抗 1:5 000, 北京军事医学科学院; 西维因 GBW(E) 060223, 纯度 > 99.9%, 国家标准物质研究中心。

ELISA 所用试剂: 碳酸盐缓冲液 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,

收稿日期: 2003-01-11

基金项目: 农业部“948”项目: 一种新型农产品农药残留快速检测技术的引进

作者简介: 许 艇(1971—), 男, 博士。E-mail: xt8@sina.com

pH9.6; 稀释液 (PBST), $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.2 PB, $0.14 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 0.05% 吐温-20; 封闭液, 0.5% 明胶, 0.02% NaN₃; A 液: 过氧化脲 1 g, 10.3 g 柠檬酸, 35.8 g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 吐温-80 100 μL, 蒸馏水 1 000 mL, pH5; B 液: 四甲基联苯胺 (TMB) 700 mg (40 mL DMSO 溶解), 10.3 g 柠檬酸, 蒸馏水 960 mL, pH2.4; 洗涤液, PBS 加 0.05% 吐温-20; 终止液, $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂SO₄; 以上所用化学试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

Wellsan MK3 酶联免疫检测仪, 芬兰 Labsystems dragon; LKB Biochrom 4060 紫外可见分光光度计, 瑞典 Pharmacia; TGL-16G 台式高速冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂; HH-8 电热恒温水浴箱, 常州国华仪器厂; FD-1 冷冻干燥机, 北京博医康技术公司; LD4-2A 低速离心机, 北京医用离心机厂; ACF-300 MHz 核磁共振仪, BRUKER。

1.2 半抗原合成

1.2.1 氯甲酸萘酯的制备 (产物 1)

5.6 g NaOH (0.139 mol) 溶于 56 mL 蒸馏水中; 在溶液中加入 20 g α-萘酚 (0.139 mol)。混合物在 85 °C 下搅拌反应 1 h, 冷却至室温。在通风橱内缓慢加入过量的三光气 (19.3 g 三光气 + 100 mL 甲苯; 三光气剧毒, 小心), 室温下搅拌反应 1 h。有机相用无水 Na₂SO₄ 干燥, 真空减压脱掉有机溶剂, 得棕色油状物质。将它溶于二氯甲烷, 然后真空蒸馏 (1 mmHg) 收集 100 °C 的馏分, 得 13.7 g (48%) 淡黄色油状产物 1。

1.2.2 6-(1-萘氧基甲酰胺)-己酸的合成 (产物 2)

称 7.37 g 6-氨基己酸 (56.1 mmol) 溶于 7.5 mL $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 中, 冷却至 4 °C。将 6.25 g 产物 1 (30.3 mmol) 溶于 11 mL 1,4-二氧杂环己烷中, 冷却至 4 °C, 然后与 7.5 mL $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 混合, 分 5 次等批量加入 6-氨基己酸碱液中, 每次加入至少间隔 5 min, 混合液搅拌反应 3 h 后, 用浓盐酸将 pH 值调至 4, 这两步反应均在冰浴中进行。所得油状产物用乙酸乙酯萃取 ($3 \times 35 \text{ mL}$), 有机相用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸洗涤 ($2 \times 15 \text{ mL}$), 然后用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaHCO₃ 萃取 ($3 \times 50 \text{ mL}$), 萃取液最后在冰浴中用 pH3 的浓盐酸酸化, 得黄色固体物, 用蒸馏水洗涤 2 次, 干燥后得 7.5 g 粗产物, 用无水乙醇重结晶, 得 4.8 g 干燥白色产物 2 (65%), 熔点 128 °C ~ 130 °C。核磁共振氢谱: 1H NMR (DMSO-d₆) δ 1.36 (m, 2H, CH₂), 1.52 (m, 4H, 2CH₂), 2.24 (t, 2H, CH₂COOH), 3.11 (q, 2H,

CH₂NH), 7.27 ~ 8.04 (m, 8H, aromatic C₁₀H₇, NH), 12.02 (br, 1H, COOH); 产物 2 即为所需半抗原, 如图 2 所示。

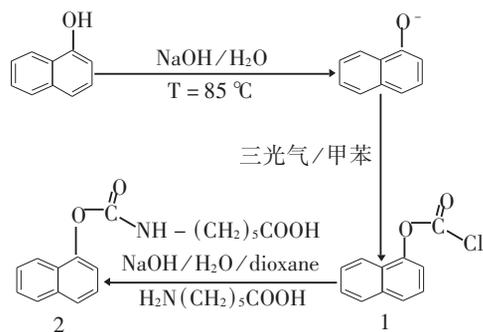


图 2 半抗原合成的反应设计

Figure 2 Reaction scheme of the synthesis of hapten

1.3 免疫原和包被抗原的合成

1.3.1 免疫原的合成

将 30.2 mg 半抗原 (约 0.1 mmol)、13.9 mg NHS (0.12 mmol) 和 24.3 mg DCC (0.118 mmol) 溶于 1 mL 无水 DMF 中, 室温下搅拌反应 18 h。反应液离心, 取上清液。称 30 mg BSA 溶于 2 mL 的碳酸盐缓冲溶液 ($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH9.6) 中, 逐滴加入 50 μL 上清液, 滴加时缓慢操作, 约 15 min 加完。然后室温下搅拌反应 4 h。反应液装入透析袋用 PB ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.4) 透析。每 6 h 换液一次, 总共换液 5 ~ 6 次。透析后离心, 上清液冷冻干燥, 4 °C 保存。

1.3.2 包被抗原的合成

称 5.4 mg 半抗原 (约 18 μmol) 溶于 200 μL 无水 DMF 中, 然后按顺序加入 4.27 μL (约 18 μmol) 三正丁胺、2.34 μL (约 18 μmol) 氯甲酸异丁酯, 室温下搅拌反应 1 h。称 30 mg OVA 溶于 2 mL 碳酸盐缓冲溶液 ($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH9.6) 中, 搅拌下逐滴加入 100 μL 第一步反应液, 约 20 min 加完, 室温下搅拌反应 3 h。然后透析、离心、冷冻干燥, 4 °C 保存。

1.4 半抗原与载体蛋白的偶联比率估算^[16]

准确称取半抗原 (A)、BSA (B)、半抗原-BSA (C), 用同一缓冲液配成确切的浓度。然后分别测定这 3 种溶液在 A 物质和 B 物质最大吸收峰波长处 (紫外扫描求得) 吸光值, 即 AA_{am} , AA_{bm} , AB_{am} , AB_{bm} , AC_{am} , AC_{bm} 。同时计算 A 物质在 A 和 B 吸收峰波长处的克分子消光系数, 即 KA_{am} , KA_{bm} ; 以及 B 物质在 A 和 B 吸收峰波长处的克分子消光系数, 即 KB_{am} , KB_{bm} 。按以下公式计算 A 物质和 B 物质的克分子比:

$$\text{克分子比} = (AC_{am} \cdot KB_{bm} - AC_{bm} \cdot KB_{am}) /$$

$(AC_{bm} \cdot KA_{am} - AC_{am} \cdot KA_{bm})$

1.5 抗体的制备

两只体重约 2.5 kg 的健康新西兰大耳白兔, 在动物房观察饲养一周。称 2.5 ~ 3 mg 免疫原(以载体蛋白计算)溶于 1 mL 无菌生理盐水中, 与 1 mL 的弗氏完全佐剂混合并充分乳化, 注射兔大腿肌肉进行初次免疫。以后换用弗氏不完全佐剂, 每隔两周加强免疫一次, 颈背部皮下多点注射。

从第三次免疫后开始, 每次免疫后 10 d 左右, 用 1 mL 无菌注射器从耳边缘静脉取血 0.5 ~ 1 mL, 以间接 ELISA 法测定血清效价。当抗血清达到所需的效价时, 第五次免疫后 7 ~ 10 d, 无菌状态下颈动脉采全血。于室温下静置 2 h, 再置 4 °C 冰箱中过夜使之充分收凝。次日以 4 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 收集血清, 4 °C 保存。

1.6 抗血清效价测定

采用间接 ELISA 测定抗血清效价, 以包被抗原浓度为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 包板, 将抗血清倍比稀释成不同的浓度加入酶标板中(100 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$), 同时以阴性血清作对照, 重复 3 次; 随后加入 HRP 标记羊抗兔二抗 1:5 000(100 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$), 再加入 A、B 液各 50 μL , 避光显色 15 min 后, 每孔加入 50 μL 终止液, 于 450 nm 波长处测定其光密度(OD)值。效价定义为当抗血清 OD 值等于对照 OD 值 2 倍时的稀释倍数。

1.7 抗体的纯化

采用硫酸铵分级盐析, 脱盐后获得粗 IgG, 再将所获粗 IgG 进一步经纤维素 DE-52 离子交换层析, 用 PBS(0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH7.4)洗脱, 收集第一和第二吸收峰, 收集液浓缩后冻干, 4 °C 保存。具体操作见文献[7]。

1.8 抗体与西维因的亲中性

(1) 在 96 孔酶标板中每孔加入 100 μL 包被抗原(浓度为 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 4 °C 过夜, 弃包被液, 洗涤液洗 3 次。

(2) 加入封闭液(150 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$) 在 37 °C 下封闭 1 h, 弃封闭液, 洗涤同上。

(3) 将 50 μL 不同浓度(0、5、10、50、100、500、1 000、5 000、10 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的西维因标准液加入酶标板, 每个浓度重复 3 次, 再加入 50 μL 的西维因抗体(1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 37 °C 温育 30 min, 弃液后洗板。

(4) 每孔加入 100 μL 羊抗兔酶标二抗(1:5 000), 37 °C 温育 30 min, 洗板。

(5) 先后加入 A、B 液各 50 μL , 避光显色 15 min

后, 每孔加入 50 μL 终止液, 于 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。

将含 0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准品孔的 OD 值减去含最大浓度标准品孔的 OD 值定为 B_0 , 其余孔经同样方法校正后的 OD 值定为 B; 以 $\text{logit}(B/B_0)$ 值为纵坐标, 相应的标准品浓度的 log 值为横坐标, 绘制 $\text{logit} - \text{log}$ 标准曲线。

2 结果与分析

2.1 半抗原与载体蛋白的偶联结果

经紫外扫描, 半抗原在 280 nm 处有吸收峰 $A_{280} = 2.440$, BSA 在波长 278 nm 处有吸收峰 $A_{278} = 0.359$, 偶联物在 279 nm 处有吸收峰 $A_{279} = 0.655$, 所得偶联物的紫外吸收光谱兼具载体蛋白和半抗原的特征, 表明半抗原与 BSA 已经偶联; 根据公式计算, 半抗原与 BSA 的结合比约为 26:1。

2.2 抗血清的效价

本实验获得了高效价的抗血清, 效价 $> 6.4 \times 10^5$, 图 3 为抗血清的效价曲线。

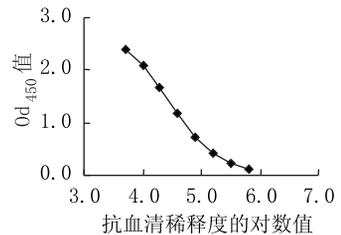


图 3 间接 ELISA 检测抗血清的效价曲线

Figure 3 Titration curve for determination of antisera by indirect ELISA

2.3 西维因标准曲线

图 4 为优化条件下西维因标准曲线线性化模型, 根据回归方程可以计算出, 西维因的最小检测极限为 14 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 从而可以证明本实验所获抗体对西维因有特异性, 但该抗体对西维因结构类似物及其他氨基甲酸酯类农药的特异性需进一步研究。

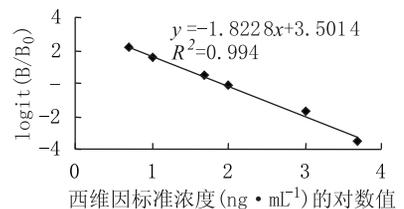


图 4 间接 ELISA 检测西维因的标准曲线

Figure 4 Standard curve for determination of carbaryl by indirect ELISA

3 讨论

由于西维因和绝大多数农药一样,属于小分子半抗原,因此在免疫动物之前,必须将半抗原与大分子载体蛋白偶联。本文参照国外的经验^[8,9],对西维因免疫原进行设计,在西维因与 BSA 之间添加了含 6 个碳原子长的臂,同时保持了西维因原有的分子结构特性,通过实验证明,该免疫原免疫动物后能获得特异性的多克隆抗体。

但是,多克隆抗体并非只有针对西维因的一种抗体,还含有针对载体蛋白、臂、联结位点等多种抗体,这些抗体都会影响西维因的 ELISA 检测,所以该抗体对西维因的亲合性不高。因此,要提高 2,4-D 的检测灵敏度,可以从以下 3 方面着手:

(1) 对 ELISA 的检测条件进行改进。

(2) 尝试抗体与不同包被抗原的组合,降低抗体对包被抗原的亲合性。

(3) 制备高特异性的单克隆抗体。

参考文献:

[1] Spittler T D, Marafioti R A, Helfman G W, et al. Determination of

Carbaryl in Honeybees and Pollen by High Performance Liquid Chromatography[J]. *J Chromatogr*, 1986, 352: 439 - 443.

[2] Branch R A, Jacqz E. Subacute Neurotoxicity Following Longterm Exposure to Carbaryl[J]. *Am J Med*, 1986, 80: 741 - 745.

[3] Schattenberg H J and Hsu J P. Pesticide Residue Survey of Produce from 1989 to 1991[J]. *J of AOAC Int*, 1992, 75: 925 - 933.

[4] Brooks M W, Tessier D, Soderstrom D, Jenkins J, Marshall Clark J. A Rapid Method for the Simultaneous Analysis of Chlorpyrifos, Isopropyl, Carbaryl, Iprodione and Triadimenfon in Groundwater by Solid - phase Extraction[J]. *J Chromatogr Sci*, 1990, 28: 487 - 489.

[5] Strait J R, Thornwall G C, Ehrlich M. Sensitive High Performance Liquid Chromatography Analysis for Toxicological Studies with Carbaryl[J]. *J Agric Food Chem*, 1991, 38: 710 - 713.

[6] 杨利国. 酶免疫测定技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998.

[7] 李成文. 现代免疫化学技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1992.

[8] Marco M P, Gee S J, Cheng H M, et al. Development of an Enzyme - linked Immunosorbent Assay for Carbaryl[J]. *J Agri Food Chem*, 1993, 41: 423 - 430.

[9] Antonio Abad, Angel Montoya. Production of Monoclonal antibodies for carbaryl from a Hapten Preserving the Carbamate Group[J]. *J Agri Food Chem*, 1994, 42: 1818 - 1823.

欢迎订阅《农业环境与发展》2003 年增刊——农业规划环境影响评价论文集

2003 年 9 月 1 日《中华人民共和国环境影响评价法》的颁布实施,标志着已在我国施行多年的环境影响评价制度上升到了新的高度,以法律的形式确立了环境影响评价的地位。为了配合《中华人民共和国环境影响评价法》的实施,特邀请我国环评专业领域、农业环保领域和其他相关领域的专家撰写了相关论文,编辑出版了《农业规划环境影响评价论文集》。本论文集内容丰富,包括农业规划环境影响评价的方法学研究、法律问题、国内外动态、新技术等。为从事农业环境影响评价工作的科技人员提供了翔实的参考资料。

《农业规划环境影响评价论文集》96 页,订价 6 元,有需要者请与《农业环境与发展》编辑部联系。

地址:天津市南开区复康路 31 号

邮编:300191

电话:022 - 23674336