

除虫脲农药残留的酶联免疫测定方法

王 硕, 刘 佳, 王俊平

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津市“食品营养与安全”重点实验室, 天津 300222)

摘 要:通过研究除虫脲半抗原的合成、分离纯化方法和多克隆免疫抗体的制备,建立了直接竞争酶联免疫吸附检测法(ELISA)。结果表明,所制备的抗体对除虫脲的特异性好,免疫检测灵敏度高、稳定性好,土壤(90%甲醇萃取)、水样及其他样品基质基本不对检测结果造成影响,对除虫脲的检测限可以达到 $0.05\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ 。对土壤和水样的添加试验回收率均超过 80%。

关键词:除虫脲; 免疫吸附检测法; 杀虫剂; 环境分析

中图分类号:X830.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)06-1254-05

Immunoassay Method for the Analysis of Insecticide Diflubenzuron

WANG Shuo, LIU Jia, WANG Jun-ping

(Tianjin Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Faculty of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract: A rapid and sensitive ELISA with simple extraction procedure was developed for screening and quantitative detection of insecticide diflubenzuron in soil and water samples. Conjugates of diflubenzuron derivatives with proteins were prepared with attachments at the 4-position of aniline ring, where bridging groups of varying length were used between the hapten and the protein carrier. Polyclonal (Pab) antibodies were generated and their specificities were assessed by cross reaction with numbers of pesticides that had similar structures with diflubenzuron and pesticides that might reasonably be found in agricultural system of China. The developed assay was very specific to diflubenzuron, and no significant matrix effects from soil (90% methanol extraction), water and other pesticide residues were observed. The detection limit for diflubenzuron in soil and water by this method (LOD) was $0.05\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$, with the recovery rate more than 80%. This assay could be a convenient and supplemental analytical tool for monitoring diflubenzuron residues in environmental and agricultural samples.

Keywords: diflubenzuron; enzyme-linked immunosorbent assay; insecticide; environmental analysis

除虫脲是一种苯甲酰脲类杀虫剂,它可阻碍昆虫几丁质的合成,使昆虫最终因不能蜕皮而死亡,被广泛地用于农、林、卫生等领域。随着人们对于生态环境和食品安全关注程度的提高,除虫脲在环境和食品中的残留即可能造成的危害越来越为人们所关注。我国、美国和欧盟国家均把环境、农产品和食品中除虫脲残留作为重点检测对象。

进行除虫脲残留分析的传统方法是用气相色谱或高效液相色谱。虽然色谱法灵敏,但是费用昂贵且

耗时耗力,不适用于现场快速检测,需要建立新的分析方法以便能在短时间内对现场大量样本进行快速检测。酶联免疫检测法操作简单、检测时间短、准确度高,非常适用于快速检测,近些年被广泛用于农药残留及其他物质的快速检测中。

本文研究了除虫脲半抗原的合成方法并制备了除虫脲的免疫抗体,在此基础上建立了除虫脲的竞争性免疫检测法,该方法的实际检测限可以达到 $0.05\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ 。

1 试验材料

1.1 试验试剂

试验所用血蓝蛋白(KLH)、卵清蛋白(OA)购自

收稿日期:2004-12-02

基金项目:国家自然科学基金项目(30440007)

作者简介:王 硕,男,教授,博士生导师,从事小分子物质免疫检测和食品安全研究。E-mail:s.wang@tust.edu.cn

美国 Pierce 公司,牛血清白蛋白(BSA)和辣根过氧化物酶(HRP)购自德国 Boehringer-Mannheim 公司,鱼皮胶 (FG)、Tween 20 和弗氏佐剂购自美国 Sigma 公司,用于半抗原合成的其他有机化学试剂均购自美国 Aldrich 公司,分析用的除虫脲标准样品购自美国的 Uniroyal 化学品公司。

1.2 仪器

试验所用酶标板购自丹麦 Nunc 公司。酶标仪为 Stat Fax 2100。

2 试验方法

小分子物质本身不能够引起免疫反应,要想获得某种小分子物质的特异性抗体,建立免疫检测方法,首先需要合成半抗原,然后将半抗原连接到载体蛋白上构成免疫原,将免疫原免疫动物后才能够获得特异性抗体。半抗原的合成是建立小分子免疫检测的关键步骤,所合成的半抗原必须尽可能在结构上与待测物质相似,而又要便于和载体蛋白联接。

2.1 半抗原的合成

半抗原 I (1-[4-氨基苯基]-3-[2,6-二氟苯酰]脲)的合成方法与芳基脲的合成方法相似^[1];半抗原 II (半抗原 I 的半琥珀酸酯)用半抗原 I 的 N-酰化苯胺的氨基与琥珀酸酐合成。其分子式如图 1 所示。2 种半抗原的合成方法如下:

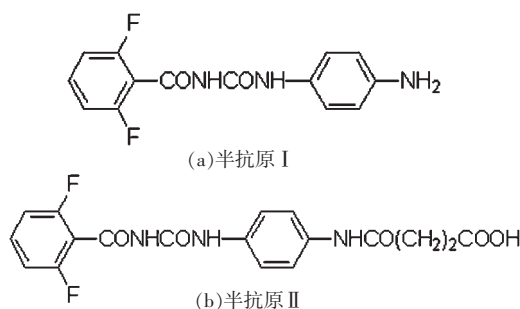


图 1 2 种半抗原的分子式

Figure 1 Chemical structure of hapten I and hapten

2.1.1 制备 2,6-二氟苯酰异氰酸酯溶液

取 11.8 g (75 mmol)搅拌过的 2,6-二氟苯酰异氰酸酯悬浮液加入 65 mL 无水的 1,2-二氯乙烷中,再添 9.5 mL 新蒸馏的乙二酰氯。最初的放热反应过后,在反应物中通氮气回流过夜。然后溶剂经减压蒸馏,残留液在真空状态下蒸馏,回收率为 87%。

2.1.2 制备 1-(4-硝基苯基)-3-(2,6-二氟苯酰)脲

先将 4.96g (27.1 mmol) 的 2,6-二氟苯酰异氰酸酯溶液加入 15 mL 苯中,再将 3.36g(24.3 mmol)4-硝

基苯胺溶于 50 mL 苯中,然后将 2,6-二氟苯酰异氰酸酯溶液加入 4-硝基苯胺溶中。混合物在室温下搅拌过夜,溶剂经减压蒸发,残留物在乙酸乙酯中重结晶,可以得到黄色的 1-(4-硝基苯基)-3-(2,6-二氟苯酰)脲晶体,回收率为 88%。

2.1.3 半抗原 I 的制备

取 1-(4-硝基苯基)-3-(2,6-二氟苯酰)脲 5g (15.6 mmol) 溶于 85 mL 的 1-甲基-2-吡咯烷酮,室温,1 个标准大气压下,该溶液在含有超过 10% 钼的活性炭(0.5 g)上用氢还原过夜。随后反应物用硅藻土过滤,加水后沉淀,得到半抗原 I 的黄色粉末。用乙酸乙酯(3.9g, 86%)重结晶获得纯化物。

2.1.4 半抗原 II 的制备

将 700 mg 半抗原 I (2.4 mmol)和 720 mg 琥珀酸酐(7.2 mmol)在 25 mL 吡啶中回流 3 h。吡啶经减压蒸发后得到的黑色油脂用 30 mL 乙酸乙酯搅拌。固体沉淀物经若干次乙酸乙酯的重结晶得到半抗原 II 的白色针状结晶。

2.1.5 半抗原 II 活性酯的制备

取 131 mg 半抗原 II (0.33 mmol)和 42.3 mg N-羧基琥珀酰亚胺(NHS, 36.7 mmol)溶于 4 mL 新蒸馏过的四氢呋喃(THF)中。在此溶液中边搅拌边加入 75.8 mg 的 N,N'-二环乙基碳二亚胺(DCC, 36.7 mmol),室温下通氮气搅拌 3.5 h。滤除沉淀物并用 THF 洗脱后减压蒸发将 THF 蒸出,得到的白色固体残留物用薄层层析(乙酸乙酯:丙酮=2:1)纯化生成白色固体状的半抗原 II 活性酯。

2.2 免疫原的合成

将 2 种半抗原分别与载体蛋白 (OA 和 KLH)连接制备免疫原。半抗原 I 与载体蛋白的连接用重氮法^[2]。半抗原 II 通过活性酯法与载体蛋白联接^[3]。偶联蛋白质的浓度用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[4]确定。

2.3 免疫动物制备抗体

免疫动物选用雌性新西兰大白兔,采取皮下和肌肉注射方式进行免疫。初次免疫的剂量为 1 mg(溶于 0.5 mL 0.9% 的 NaCl 和 0.5 mL 的弗氏完全佐剂),随后在第 2、4、6 周用 0.5 mg (溶于 0.5 mL 0.9% 的 NaCl 及 0.5 mL 的弗氏不完全佐剂)的剂量进行加强免疫,以后的免疫间期为 1 个月。在每月免疫后的第 9 d,从兔子的耳缘静脉采血进行抗体效价检测,当效价达到最高时进行采血。采血后将血液静止 24 h,然后取血清进行抗体纯化。采取免疫亲和层析法(G-Sepharose 柱)纯化抗血清^[5],所得抗体添加 0.1%(m/V)的叠氮钠

后于 4 ℃储存。

2.4 酶标物的制备

用 HRP 与半抗原制备酶标抗原。连接方法基本与免疫原合成方法相同(重氮法不能用于半抗原 I 与酶的联接)。

3 直接竞争性 ELISA 方法的建立

3.1 溶液体系

(1)包被缓冲液:Na₂CO₃ 1.6 g,NaHCO₃ 2.9g,加双蒸水至 1 L,调节 pH 到 9.6。

(2)洗涤液(PBST,pH7.4):0.05%(V/V) Tween-20 溶于 1 倍 PBS 中。

(3)封闭液(1% BSA/PBS 溶液):10 mL BSA,PBS (pH7.4)990 mL。

(4)底物液:TMB-过氧化氢脲溶液。
底物液 A:无水醋酸钠 8.2 g,β-糊精 2.5 g,过氧化氢脲 428.6 mg,加双蒸水至 1 L,调 pH 至 5.0,4℃保存,使用时达室温。

底物液 B:TMB 200 mg,DMSO 10 mL, 加双蒸水至 1 L,棕色瓶保存。

使用前 15 min 将 A 和 B 混合,每板底物液用量:14.6 mL A 液+0.45 mL B 液。

(5)终止液:1.25 mol·L⁻¹ 的 H₂SO₄ 溶液。

3.2 检测方法

(1)包被抗体:在酶标板上每孔加入浓度为 0.01 μg·μL⁻¹ 的包被抗体溶液,室温温育过夜。洗涤液洗板 3 次。

(2)封闭:用封闭液(150 μL·孔⁻¹)封闭 1 h,弃封闭液,用吸水纸吸干酶标板。

(3)加酶标抗原:每孔先加入 50 μL 除虫脲标样溶液(除虫脲溶于 0.1%(W/V) 的含 5%甲醇的鱼皮胶-PBS 中),然后加入 50 μL 酶标抗原溶液(酶标抗原溶于 0.1%(W/V)的含 5%甲醇的鱼皮胶-PBS 中),

孵育 1 h。反应完成后用洗涤液洗板 5 次。

(4)显色:在每个孔中加入 150 μL 底物液,于室温下反应 30 min。

(5)终止反应:添加 50 μL·孔⁻¹ 的终止液,终止反应,用酶标仪读取 OD 值。

4 结果与讨论

4.1 半抗原的选择和结合

半抗原与载体蛋白的相对距离越远,则其产生的抗体的特异性越好^[6]。除虫脲包含一个在第 2 和第 6 位被氟原子取代的苯环,与苯胺的氨基端反应生成一种衍生物,在该衍生物中苯基脲基团的特征结构可以稳定存在,这一特征结构从理论上提供了合成除虫脲半抗原、制备特异性抗体的有效方法。同时设计了半抗原 II,即通过联接 1 个氨基化合物,产生 1 个更长的间隔臂。

通常用于联接的基团的最佳长度和构型是包含 4 到 6 个原子的直链型结构。用 4-硝基苯胺合成半抗原 I 相对容易。这种半抗原用重氮法与蛋白质形成一个短链,并通过活性酯法连接第 10 和第 8 位碳的间隔臂。半抗原 I 与琥珀酸酐连接可产生出含有 4 个碳的间隔臂的半抗原 II。

半抗原 I 可以用活性酯与蛋白质或辣根过氧化物酶连接,因为大部分酶的活性位点附近或其中存在组氨酸或酪氨酸的残基^[7],所以与重氮盐的偶合经常导致酶活性的大量损失^[3]。因此用活性酯法代替重氮法用于结合半抗原 I 和 HRP。

4.2 灵敏度

用不同免疫原检测酶标记物对除虫脲的灵敏度(稀释度为 1/500)。每个组合重复 5 次,得到的 IC₅₀(竞争抑制率达 50%时对应的除虫脲浓度)的结果如表 1 所示。

表 1 使用不同免疫原和酶结合物对除虫脲的 IC₅₀
Table 1 IC₅₀(μg·dm⁻³)for diflubenzuron using different immunogen and enzyme conjugate combinations

免疫原	半抗原 I -BDE-HRP	半抗原 I -DSS-HRP	半抗原 II -HRP
半抗原 I -OA	14±2.1	8.9±1.5	72±23
半抗原 I -KLH	5±0.4	2.0±0.3	3.2±0.7
半抗原 I -DSS-OA	180±40	130±31	170±45
半抗原 I -BDE-OA	165±55	150±45	190±35
半抗原 II -OA	4.1±0.3	0.6±0.2	3.1±0.9
半抗原 II -KLH	2.1±0.2	1.4±0.4	2.4±0.8

$$IC_{50} = \frac{\text{空白 } IC_{50} - \text{样品 } IC_{50}}{\text{对照 } IC_{50} - \text{样品 } IC_{50}} \times 100$$

在多数情况下,用同样的酶标记物,半抗原Ⅱ所产生抗体的检测灵敏度高于半抗原Ⅰ产生的抗体。但是,在使用 DSS 和 BDE 作为半抗原和载体蛋白的交联剂时,虽然可进一步增大半抗原和蛋白质的间隔,却并没有得到对除虫脲有较高灵敏度的抗体。该结果表明只有间隔臂适当时才能产生特异性的抗体。

表 1 结果显示用半抗原Ⅱ-OA 作为免疫原且用半抗原Ⅰ-DSS-HRP 为酶标,方法的灵敏度最好。因此选用这两种物质进行下一步研究。

4.3 检验方法的优化

为检验溶剂对试验的影响,选用甲醇、丙酮、乙腈和 DMSO 作萃取溶剂,将 4 种溶剂用缓冲液分别稀释成 1%、5%、10%,再将 2 000 μg·dm⁻³ 的除虫脲标准品在不同浓度的 4 种溶液中连续稀释,通过比较各种浓度溶剂(在 0.1%的 FG-PBS 中)对除虫脲 ELISA 影响的标准曲线来确定溶剂的作用。如表 2 所示,检定的灵敏度在 4 种浓度的甲醇溶液中几乎没有变化,在其他 3 种溶剂中也存在类似结果,这表明水溶性溶剂适用于除虫脲的 ELISA。4 种溶剂在 5%浓度时对 ELISA 的灵敏度影响都有限,但丙酮和 DMSO 会引起了少量颜色变化,所以应选择浓度为 5%~10%的甲醇为萃取溶剂^[8]。

表 2 不同有机溶剂对除虫脲 ELISA 检测的影响
Table 2 Effect of different organic solvents (5%)on the performance of diflubenzuron ELISA

溶剂	吸光值	IC ₅₀ (ppb)
甲醇	0.95	0.6
丙酮	0.74	0.8
乙腈	0.88	0.8
二甲基亚砷	0.53	0.9

ELISA 中常使用蛋白质(如硬骨鱼类的鱼皮胶)和洗涤剂(如 Tween 20)以减少非特异性的交互作用,通过比较分析 PBS, PBST, 0.1%FG-PBS, 和 0.5%FG-PBS 4 种不同的酶标稀释液对除虫脲 ELISA 检测灵敏度的影响发现:添加 Tween 20 的 PBST 会降低灵敏度,而其他 3 种酶标稀释液对灵敏度的影响不大,但是影响程度略有差别,0.5%的鱼皮胶会使最终显色颜色变浅,而 PBS 会引起不同重复之间的标准差变大。

4.4 特异性

使用了氯溴隆、敌草隆、伏草隆、绿谷隆、秀谷隆、甲氧隆、草不隆、3-(3,4-双氯苯基)-1-甲基脲、3,4-

双氯苯基脲等苯甲酰基脲类农药的结构类似物、4-氯苯胺、2,6-双氯苯甲酰胺、2,6-双氟苯甲酸等除虫脲的代谢产物和一氟氯菊酯、DDE、DDT、硫丹和 λ-氯氟氰菊酯等在农产品中发现有残留但是与除虫脲结构不同的农药进行抗体特异性分析。试验结果显示这些化合物的 IC₅₀ 值均超过 10 000 μg·dm⁻³, 这表明抗体对除虫脲特异性良好,不与其结构类似物发生交叉反应,进一步说明目标物结构中的芳环和尿素部分对抗体的结合起决定作用。

4.5 土壤和水样中除虫脲的添加回收率

用取自天津远郊的棉花地、从未使用过除虫脲的土壤作为实验材料。在一个玻璃罐中放 10 g 风干的土壤,向其中加入浓度为 0.1、0.5、1、5、10 mg·dm⁻³ 的除虫脲标准品,重复 3 次。待其与土壤彻底混合后在室温下放置 48 h 使除虫脲与土壤呈匀胶状态。然后加入 20 mL 90%的甲醇,于摇床上振动 3 h 后放置过夜。用 0.1%的 FG-PBS 缓冲液将上清液稀释 10 倍。用从未使用过除虫脲的水样(pH7.4)来评价潜在的基质干扰。用土壤萃取物、水样、及 0.1% FG-PBS 缓冲液的标准曲线比较添加除虫脲后的结果(图 2),在水样中分别添加 0、20、50、100 μg·dm⁻³ 的除虫脲标准品,不进行进一步处理即用 ELISA 分析,5 种不同浓度的除虫脲的回收率试验结果见图 3 和图 4,实际回收率都超过了 80%。可知其检测限为 0.05 μg·dm⁻³, 且标准曲线的重叠表明水样及土壤萃取物没有明显的基质影响。

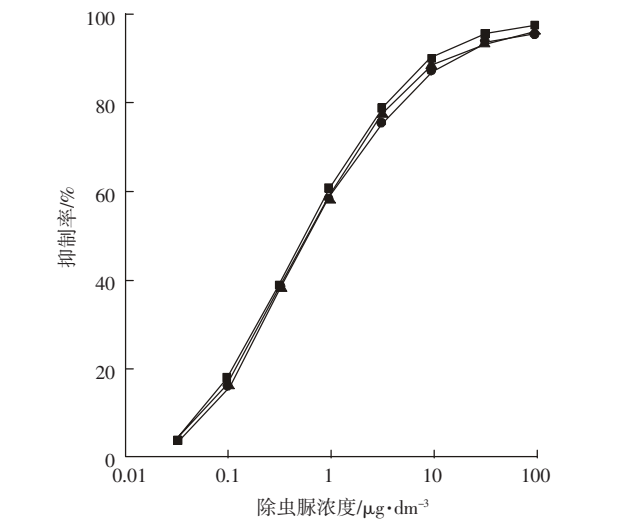


图 2 水中■、土壤萃取物●和 0.1%FG-PBS+中除虫脲的标准曲线
Figure 2 Standard curves for diflubenzuron in water■,soil extract ●and 0.1% FG-PBS+

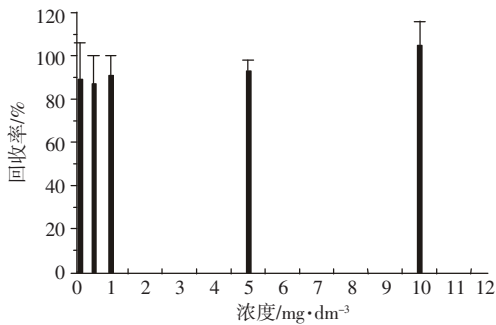


图3 土壤中添加0.1、0.5、1、5、10 mg·dm⁻³的除虫脲的回收率

Figure 3 Recovery rates of diflubenzuron spiked at five concentrations(0.1,0.5,1,5,10 mg·dm⁻³)in soil

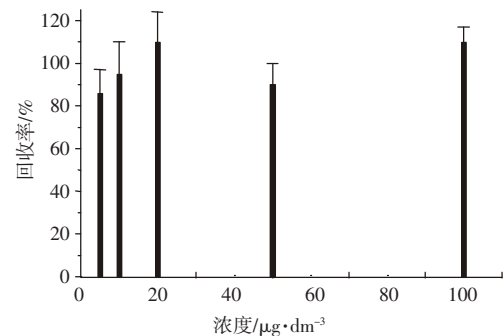


图4 水中添加0.1、0.5、1、5、10 µg·dm⁻³的除虫脲的回收率

Figure 4 Recovery rates of diflubenzuron spiked at five concentrations(0.1,0.5,1,5,10 µg·dm⁻³)in water

5 结论

ELISA 法检测除虫脲的 IC₅₀ 值低于 50 µg·dm⁻³ 且检测限小于 3 µg·dm⁻³, 其灵敏度足以检测出土壤中含量为 0.1 µg·dm⁻³ 的除虫脲。交叉反应及回收研

究也表明环境基质和其他农药对除虫脲的检测均无影响。

参考文献:

[1] Wellings K, Mulder R, Van Daalen J J. Synthesis and laboratory evaluation of 1-(2,6 disubstituted benzoyl)-3-phenylureas, a new class of insecticides [J]. *J Agric Food Chem*, 1973, 21:348-354.

[2] Sheth H B, Sporns P. Development of a single ELISA for detection of sulfonamides[J]. *J Agric Food Chem*, 1991, 39:1696-1700.

[3] McAdam D P, Hill A S, Beasley H L, et al . Mono- and polyclonal antibodies to the organophosphate fentrothion [J]. *J Agric Food Chem*,1992, 40:1466-1470.

[4] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochemistry*,1976, 72:248-254.

[5] Akerstrom B, Brodin T, Reis K, et al. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies [J]. *J Immunology*,1995, 135:2589-2592.

[6] Skerritt J H, Hill A S, Sashidhar Rao R B, et al. Sample matrix interference in immunoassays for organochlorine residues in plant-derived foods and some strategies for their removal [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2003, 15: 17-34.

[7] Averameas S, Ternynck T, Guesdon J L. Coupling of enzyme to antibodies and antigens [J].*Scandinavian J Immunology Supplement*,1978,8:7-23.

[8] Bester K, Bordin G, Rodriguez A, et al. How to overcome matrix effects in the determination of pesticides in fruit by HPLC-ESI-MS-MS [J]. *Fresenius J Anal Chem*, 2001, 371: 550-555.

[9] Deng A, Kolar V, Ulrich R, et al. Direct competitive ELISA for the determination of polychlorinated biphenyls in soil samples [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2002, 373:685-690.