

# 硫代磷酸二乙酯类农药半抗原 设计及抗体识别特性

谢桂勉, 孙远明, 徐振林, 李永祥, 雷红涛, 王 弘, 沈玉栋  
(华南农业大学食品学院, 广东省食品安全重点实验室, 广州 510642)

**摘要** 通过分析硫代磷酸二乙酯类农药的结构特点, 设计并合成了系列半抗原; 采用活泼酯法将半抗原分别与牛血清蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)偶联制备了系列免疫原和包被原; 通过免疫新西兰大白兔获得了相应抗硫代磷酸二乙酯类农药的类特异性抗体. 建立检测硫代磷酸二乙酯类农药的间接竞争酶联免疫分析(ELISA)方法, 分析探讨了免疫半抗原结构对抗体特性的影响, 并阐述了包被半抗原结构对ELISA灵敏度的影响规律. 结果表明, 手臂取代位置在苯环对位且手臂较短的免疫原具有较好的免疫效果, 同时异源包被可以显著提高ELISA方法的灵敏度. 由抗体PAb-HI和包被原H6-OVA建立的间接竞争ELISA方法可以同时检测7个广泛使用的有机磷农药, 其半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)分别为蝇毒磷(0.013 mg/L)、对硫磷(0.348 mg/L)、啶硫磷(0.022 mg/L)、三唑磷(0.035 mg/L)、甲拌磷(0.751 mg/L)、除线磷(0.850 mg/L)及辛硫磷(1.301 mg/L), 最低检测限符合国内外相关有机磷药物最大允许残留限量标准(MRLS)的检测要求.

**关键词** 有机磷农药; 类特异性抗体; 异源包被; 酶联免疫分析

**中图分类号** O627; O652.1

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2009)11-2193-06

有机磷农药由于具有高效、广谱及廉价等特点, 在农业和种植业上广泛使用<sup>[1]</sup>. 有机磷农药能抑制胆碱酯酶活性, 对人类及动物具有神经毒性作用, 会引起神经功能紊乱、震颤、精神错乱、语言失常等中毒症状<sup>[2]</sup>. 2002年中华人民共和国公布的第199号公告明令禁止或限制17种有机磷农药在蔬菜、果树、茶叶及中草药材上的使用. 目前, 针对有机磷农药检测和监控的手段主要以气相色谱(GC)<sup>[3]</sup>及液相色谱(HPLC)<sup>[4]</sup>为主, 但由于其操作复杂、费时、成本高, 且通常需要进行繁琐的样品前处理, 难以适应大批量样品的快速测定. 免疫分析方法如酶联免疫分析(ELISA)等具有特异性高、灵敏度高、操作简单快速及成本低等特点, 非常适用于精密仪器确证前的高通量快速筛查, 目前已有许多关于利用免疫分析方法检测食品中有机磷农药残留的报道<sup>[5~7]</sup>. 但已报道的大多数免疫分析方法都只能检测一种有机磷农药. 在实际应用中, 多种有机磷农药复配使用现象普遍. 因此建立能同时检测多种有机磷农药残留的快速免疫分析方法, 既可以提高检测效率, 又进一步降低检测成本<sup>[8]</sup>. 目前通过制备类特异性抗体来建立同时检测多种有机磷农药残留的免疫检测方法已有报道. 但这些方法在灵敏度、特异性及检测限差异等方面仍存在较大缺陷<sup>[9~13]</sup>. 本文选择在使用广泛的硫代磷酸二乙酯类有机磷农药为研究对象, 设计合成了系列半抗原, 研究半抗原结构对抗体特性的影响以及不同包被原对ELISA方法灵敏度的影响, 从而选择最优“抗体-包被原”组合, 并建立一种可同时检测多种硫代磷酸二乙酯类有机磷农药的ELISA方法, 以期控制有机磷农药中毒及保障人类健康.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

硫代磷酸二乙酯类农药标准品购于德国 Dr. Ehrenstorfer 公司; 牛血清蛋白(BSA)、卵清蛋白

收稿日期: 2009-03-09.

基金项目: 国家“八六三”计划(批准号: 2006AA10Z447, 2007AA10Z437)、国家自然科学基金(批准号: 30901005)和广东省自然科学基金(批准号: 06300421)资助.

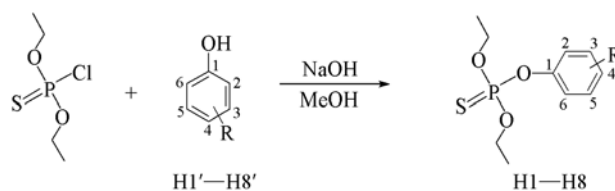
联系人简介: 沈玉栋, 男, 博士, 讲师, 主要从事食品安全研究. E-mail: sydscau@yahoo.cn

(OVA)、二环己基碳二亚胺(DCC)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、弗氏完全佐剂及弗氏不完全佐剂等购于美国 Sigma 公司; *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)购于天津大茂化学试剂厂; 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(HRP-IgG)购于武汉博士德生物工程有限公司; ELISA 工作液(自配); 其余化学试剂均为国产分析纯。

美国 Agilent HP1100 液质联用仪; 德国 Bruker DRX-400/600 核磁共振仪; 日本 Shimadzu UV-160A 紫外-可见扫描仪; 美国 Thermo MK3 多功能酶标仪; 德国 Sartorius 6K-15 高速冷冻离心机; 德国 Bruker EQUINOX 55 傅里叶变换红外光谱仪; 美国 Thermo MAT95XP 高分辨质谱仪。

## 1.2 半抗原设计、合成与鉴定

硫代磷酸二乙酯类有机磷农药结构多数含有硫代磷酸二乙酯官能团和芳香环两大特征结构部分, 根据此特点, 设计了一系列不同手臂及取代位置的半抗原(H1~H8)。其中芳基酚 H1'~H4' 为商品化试剂, 芳基酚 H5'~H8' 参照文献[14]方法合成。半抗原 H1~H8 参照文献[12]方法合成, 其合成路线如 Scheme 1 所示。化合物的表征数据分别列于表 1 和表 2。



**Scheme 1** Synthesis routes of haptens H1—H8

H1: R = 4-COOH; H2: R = 3-COOH; H3: R = 4-CH=CH-COOH; H4: R = 3-CH=CH-COOH;  
 H5: R = 4-NH-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH; H6: R = 3-NH-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH;  
 H7: R = 4-NH-CO-CH=CH-COOH; H8: R = 3-NH-CO-CH=CH-COOH.

**Table 1** Physical and spectrum analytical data of compounds H1—H8\*

Compd.	m. p. /°C	Yield(%)	IR, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	HRMS, $m/z$ (calcd.)	ESI-MS, $m/z$ [M-H] <sup>-</sup>
H5'	177—178	33.5	3333, 3073, 2933, 2632, 1695, 1660, 1608, 1554, 1514, 1420, 1331, 1285, 1230, 1191, 888, 841	209.0683 (209.0683)	208
H6'	171—172	23.9	3481, 3359, 3147, 2686, 1735, 1659, 1624, 1574, 1454, 1411, 1282, 1234, 1191, 1164, 976, 871	209.0683 (209.0683)	208
H7'	206—207	53.9	3293, 3128, 3069, 2822, 2731, 1699, 1610, 1545, 1508, 1462, 1412, 1327, 1245, 1010, 839	207.0523 (207.0526)	206
H8'	250—252	72.9	3323, 3166, 3108, 2672, 2572, 1722, 1672, 1647, 1600, 1450, 1339, 1268, 1175, 931, 858	207.0525 (207.0526)	206
H1	98—100	56.4	3073, 2987, 2904, 2669, 2550, 1685, 1600, 1426, 1290, 1214, 1162, 1024, 928, 825	290.0374 (290.0372)	289
H2	83—84	27.0	3074, 2983, 2906, 2830, 2670, 2559, 1688, 1584, 1451, 1303, 1214, 1021, 959, 828	290.0371 (290.0372)	289
H3	107—109	11.9	2988, 2958, 2925, 2854, 2677, 2585, 1692, 1627, 1598, 1506, 1425, 1283, 1215, 1168, 1021, 929, 815	316.0530 (316.0529)	315
H4	91—93	19.8	2985, 2904, 2826, 2704, 2602, 1690, 1631, 1579, 1484, 1441, 1323, 1297, 1240, 1155, 1017, 975, 825	316.0531 (316.0529)	315
H5	NA	27.6	3315, 3143, 3075, 2986, 2654, 1714, 1669, 1610, 1541, 1507, 1409, 1206, 1165, 1020, 928, 839	361.0737 (361.0743)	360
H6	NA	27.5	3331, 2990, 2923, 2737, 2639, 1714, 1693, 1606, 1532, 1436, 1331, 1187, 1154, 1024, 976, 789	361.0745 (361.0743)	360
H7	128—129	42.0	3282, 3217, 3081, 2986, 1704, 1542, 1505, 1405, 1215, 1165, 1025, 923, 848	359.0582 (359.0587)	358
H8	128—130	31.5	3286, 3222, 3083, 2981, 1706, 1527, 1414, 1304, 1243, 1154, 1022, 969, 823	359.0583 (359.0587)	358

\* NA: not analyzed because the compound is oil.

## 1.3 人工抗原的制备与鉴定

取 0.12 mmol 半抗原溶于 2 mL DMF 中, 搅拌, 加入 DCC 和 NHS 各 0.14 mmol, 于 4 °C 下磁力搅

Table 2 NMR data of compounds H1—H8

Coumpd.	NMR
H5'	<sup>1</sup> H NMR(600 MHz, Acetone-d <sub>6</sub> and TMS), δ: 2.61—2.67(m, 4H, CH <sub>2</sub> ); 6.76(d, J=8.9 Hz, 2H, ArH); 7.46(d, J=8.9 Hz, 2H, ArH); 8.10(s, br, 1H, OH); 8.98(s, br, 1H, NH); 10.73(s, br, 1H, COOH) <sup>13</sup> C NMR(150 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> and TMS), δ: 28.92, 30.81, 114.97, 120.65, 130.97, 153.01, 169.25, 173.84
H6'	<sup>1</sup> H NMR(600 MHz, Acetone-d <sub>6</sub> and TMS), δ: 2.65(s, 4H, CH <sub>2</sub> ); 6.53(dd, J=1.6, 8.0 Hz, 1H, ArH); 7.02(d, J=8.1 Hz, 1H, ArH); 7.08(t, J=8.0 Hz, 1H, ArH); 7.35(s, 1H, ArH); 8.33(s, br, 1H, OH); 9.13(s, br, 1H, NH) <sup>13</sup> C NMR(150 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> and TMS), δ: 28.76, 31.01, 106.07, 109.65, 110.00, 129.22, 140.25, 157.49, 169.87, 173.79
H7'	<sup>1</sup> H NMR(400 MHz, Acetone-d <sub>6</sub> and TMS), δ: 6.35(d, J=12.8 Hz, 1H, CH=CH); 6.68(d, J=12.8 Hz, 1H, CH=CH); 6.88(d, J=8.8 Hz, 2H, ArH); 7.55(d, J=8.7 Hz, 2H, ArH); 8.53(s, br, 1H, OH); 10.27(s, br, 1H, NH); 15.24(s, br, 1H, COOH) <sup>13</sup> C NMR(150 MHz, Acetone-d <sub>6</sub> and TMS), δ: 116.39, 123.42, 130.00, 133.03, 136.35, 156.37, 164.94, 165.13
H8'	<sup>1</sup> H NMR(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> and TMS), δ: 6.36(d, J=12.8 Hz, 1H, CH=CH); 6.67—6.72(m, 2H, ArH and CH=CH); 7.11(d, J=8.0 Hz, 1H, ArH); 7.21(t, J=8.1 Hz, 1H, ArH); 7.36(s, 1H, ArH); 10.35(s, 1H, NH) <sup>13</sup> C NMR(150 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> and TMS), δ: 106.49, 110.16, 111.16, 129.45, 130.47, 137.29, 139.54, 157.59, 161.41, 166.27
H1	<sup>1</sup> H NMR(400 MHz, CDCl <sub>3</sub> and TMS), δ: 1.36(t, J=7.1 Hz, 6H, CH <sub>3</sub> ); 4.24(qd, J=7.1, 10.0 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ); 7.26(d, J=8.1 Hz, 2H, ArH); 8.09(d, J=8.5 Hz, 2H, ArH) <sup>13</sup> C NMR(150 MHz, CDCl <sub>3</sub> and TMS), δ: 15.87(d), 65.28(d), 120.88(d), 126.66, 132.00, 154.88(d), 171.43
H2	<sup>1</sup> H NMR(400 MHz, CDCl <sub>3</sub> and TMS), δ: 1.37(t, J=7.0 Hz, 6H, CH <sub>3</sub> ); 4.25(qd, J=7.1, 9.6 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ); 7.44—7.47(m, 2H, ArH); 7.89(s, 1H, ArH); 7.93—7.94(m, 1H, ArH) <sup>13</sup> C NMR(150 MHz, CDCl <sub>3</sub> and TMS), δ: 15.89(d), 65.29(d), 122.73(d), 126.63(d), 126.97, 129.68, 130.80, 150.81(d), 171.16
H3	<sup>1</sup> H NMR(400 MHz, CDCl <sub>3</sub> and TMS), δ: 1.36(t, J=7.0 Hz, 6H, CH <sub>3</sub> ); 4.23(qd, J=7.1, 9.6 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ); 6.37(d, J=16.0 Hz, 1H, CH=CH); 7.21(d, J=8.4 Hz, 2H, ArH); 7.52(d, J=8.5 Hz, 2H, ArH); 7.74(d, J=16.0 Hz, 1H, CH=CH) <sup>13</sup> C NMR(150 MHz, CDCl <sub>3</sub> and TMS), δ: 15.90(d), 65.25(d), 117.09, 121.54(d), 129.69, 131.10, 145.84, 152.53(d), 171.60
H4	<sup>1</sup> H NMR(400 MHz, CDCl <sub>3</sub> and TMS), δ: 1.36(t, J=7.1 Hz, 6H, CH <sub>3</sub> ); 4.23(qd, J=7.1, 10.0 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ); 6.43(d, J=16.0 Hz, 1H, CH=CH); 7.22—7.23(m, 1H, ArH); 7.36—7.37(m, 3H, ArH); 7.73(d, J=16.0 Hz, 1H, CH=CH) <sup>13</sup> C NMR(150 MHz, CDCl <sub>3</sub> and TMS), δ: 15.94(d), 65.25(d), 118.28, 120.54(d), 123.25(d), 125.25, 130.05, 135.66, 145.93, 151.21(d), 171.30
H5	<sup>1</sup> H NMR(400 MHz, CDCl <sub>3</sub> and TMS), δ: 1.32(t, J=7.1 Hz, 6H, CH <sub>3</sub> ); 2.58—2.69(m, 4H, CH <sub>2</sub> ); 4.15—4.23(m, 4H, CH <sub>2</sub> ); 7.06(d, J=7.9 Hz, 2H, ArH); 7.42(d, J=8.6 Hz, 2H, ArH); 8.11(s, br, 1H, NH) <sup>13</sup> C NMR(150 MHz, CDCl <sub>3</sub> and TMS), δ: 15.60(d), 28.68, 30.87, 64.78(d), 119.92, 120.91(d), 136.49, 145.23(d), 169.93, 173.67
H6	<sup>1</sup> H NMR(400 MHz, CDCl <sub>3</sub> and TMS), δ: 1.32(t, J=7.3 Hz, 6H, CH <sub>3</sub> ); 2.60(t, J=6.3 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ); 2.69(t, J=6.2 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ); 4.19(qd, J=7.1, 9.6 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ); 6.87(d, J=7.5 Hz, 1H, ArH); 7.16—7.23(m, 2H, ArH); 7.48(s, 1H, ArH); 8.16(s, br, 1H, NH) <sup>13</sup> C NMR(150 MHz, CDCl <sub>3</sub> and TMS), δ: 15.83(d), 29.35, 31.65, 65.17(d), 112.65(d), 116.54, 129.65, 138.95, 150.85(d), 170.88, 177.15
H7	<sup>1</sup> H NMR(400 MHz, CDCl <sub>3</sub> and TMS), δ: 1.33(t, J=7.0 Hz, 6H, CH <sub>3</sub> ); 4.17—4.24(m, 4H, CH <sub>2</sub> ); 6.37(d, J=12.1 Hz, 1H, CH=CH); 6.71(d, J=9.5 Hz, 1H, CH=CH); 7.15(d, J=7.2 Hz, 2H, ArH); 7.66(d, J=7.8 Hz, 2H, ArH); 9.98(s, br, 1H, NH) <sup>13</sup> C NMR(150 MHz, CDCl <sub>3</sub> and TMS), δ: 15.92(d), 65.29(d), 121.65(d), 122.39, 133.26, 133.45, 136.01, 148.53(d), 164.47, 166.43
H8	<sup>1</sup> H NMR(600 MHz, CDCl <sub>3</sub> and TMS), δ: 1.39(t, J=7.1 Hz, 6H, CH <sub>3</sub> ); 4.26(qd, J=7.1, 9.8 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ); 6.45(d, J=12.8 Hz, 1H, CH=CH); 6.59(d, J=12.9 Hz, 1H, CH=CH); 7.05(d, J=8.1 Hz, 1H, ArH); 7.33(t, J=8.1 Hz, 1H, ArH); 7.39(d, J=8.2 Hz, 1H, ArH); 7.67(d, J=1.6 Hz, 1H, ArH); 9.28(s, br, 1H, NH) <sup>13</sup> C NMR(150 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> and TMS), δ: 15.58(d), 64.88(d), 111.65(d), 115.78(d), 116.01, 129.77, 130.00, 131.60, 139.78, 150.23(d), 163.31, 166.75

拌反应过夜. 离心后的上清液为 A 液; 称取 0.002 mmol BSA(包被原为 OVA), 于 4 °C 下缓慢溶于 10 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 PBS(pH=8.0) 中, 搅拌溶解得 B 液. 在磁力搅拌下, 将 A 液逐滴加入 B 液中, 于 4 °C 下反应 12 h. 离心取上清液, 于 4 °C 下用生理盐水透析 3 d, 每天更换 3 次透析液. 分别得到 8 个免疫原(H1-BSA ~ H8-BSA) 及 8 个包被原(H1-OVA ~ H8-OVA), 经紫外扫描鉴定后用三硝基苯

磺酸(TNBS)法测定偶联比,然后以 2 mg/mL 浓度分装于 0.5 mL 离心管中,冻存于 -20 °C 冰箱中备用.

#### 1.4 多克隆抗体的制备

用免疫原 H1-BSA ~ H8-BSA 分别免疫新西兰大白兔. 首次免疫时,取抗原与弗氏完全佐剂乳化,采用背部多点免疫健康大白兔. 间隔 21 d 后,取抗原与弗氏不完全佐剂乳化,加强免疫. 以后每隔 14 d 进行免疫. 取耳缘静脉血,采用 ELISA 方法测定抗血清效价. 待效价稳定后,再加强免疫 1 次. 最后 1 次免疫后 10 d,心脏采血,离心,保留血清. 用辛酸-硫酸铵法纯化,得到相应的多克隆抗体 PAb-H1 ~ PAb-H8. 经冷冻干燥后存放于 -20 °C 冰箱中.

#### 1.5 ELISA 方法的建立

根据方阵滴定原则,优化各“抗体-包被原”组合的包被原浓度和抗体稀释倍数. 在此基础上,建立间接竞争 ELISA 方法,制作抑制率曲线,由 Originlab 软件拟合曲线,得到抑制中浓度(IC<sub>50</sub>)值和最低检测限(LOD)值.

## 2 结果与讨论

### 2.1 抗原设计、合成与鉴定

半抗原的设计与合成是建立小分子免疫检测方法过程中最重要的步骤之一<sup>[15]</sup>. 要制备具有类特异性的抗体,所设计的半抗原必须最大程度地保持全部待分析物质的共同结构特征<sup>[8,16]</sup>. 大多数硫代磷酸二乙酯类有机磷农药都含有硫代磷酸二乙酯结构及芳香环结构,因此本研究以二乙氧基硫代磷酸酰氯及苯酚衍生物为原料,合成了一系列具有上述两种结构特征的、且在苯环的不同位置上连接不同手臂的系列半抗原,以考察半抗原结构中手臂的种类、长短及取代位置对抗体特性的影响.

半抗原与载体蛋白偶联方式对制备特异性抗体具有重要影响. 对于硫代磷酸二乙酯类有机磷农药,可以在硫代磷酸酯骨架上连接载体蛋白<sup>[17]</sup>,也可以在硫代磷酸酯结构外的取代结构上进行偶联<sup>[18]</sup>. 一般认为,硫代磷酸酯骨架对抗体的类特异性识别具有重要的作用,因此,我们选择在苯环结构上进行载体蛋白偶联,可以最大限度地暴露硫代磷酸酯基团,以便更好地刺激动物产生抗体. 紫外扫描结果表明,与半抗原及载体蛋白相比,偶联产物的最大紫外吸收峰发生明显变化,证明人工抗原合成成功. 采用 TNBS 方法对制备的人工抗原进行偶联比测定,其中免疫原偶联比普遍大于包被原偶联比,介于 18 ~ 33 之间. 研究认为<sup>[19]</sup>,偶联比在 1 ~ 30:1 范围内的免疫原都能产生较高特异性抗体.

### 2.2 免疫半抗原结构对抗体特性的影响

H1-BSA ~ H8-BSA 免疫原分别多次免疫新西兰大白兔后,获得了相应抗硫代磷酸二乙酯类农药多克隆抗体(PAb-H1 ~ PAb-H8). 采用同源包被方式(指包被原和免疫原的半抗原结构相同)建立间接竞争 ELISA,考察所获得的抗体对硫代磷酸二乙酯类农药的免疫识别特异性,结果如表 3 所示. 可以看出,所有由 8 个抗体分别建立的方法对蝇毒磷(Coumaphos)、对硫磷(Parathion)、啮硫磷(Quinalphos)、三唑磷(Triazophos)、除线磷(Dichlofenthion)、辛硫磷(Phoxim)及甲拌磷(Phorate)7 个药物的检测灵敏度较高,其 IC<sub>50</sub> 均小于 50 mg/L;而对治螟磷(Sulfotep)、二嗪磷(Diazinon)、氯唑磷(Isazophos)、乙基溴硫磷(Bromophos ethyl)和毒死蜱(Chlorpyrifos)5 个药物的检测灵敏度则相对较低. 对比硫代磷酸二乙酯类农药的结构可以发现,蝇毒磷等 7 个药物与本研究所设计的半抗原结构较为相似,芳香环结构相对简单,无复杂取代基团,因此与抗体之间结合能力较强. 而治螟磷等 5 个药物中苯环结构则相对复杂,例如二嗪磷和氯唑磷苯环上有异丙烷取代基,造成其空间位阻大,不利于抗体结合;乙基溴硫磷和毒死蜱苯环上则有多个氯或溴取代,同样形成了较大的空间位阻;而治螟磷则有 2 个硫代磷酸二乙酯结构,与其它药物结构明显不同.

分析对比各个抗体对蝇毒磷等 7 个药物的灵敏度可以发现,半抗原结构中取代手臂的位置在苯环对位时有利于获得类特异性抗体,其原因可能是手臂在苯环对位时,可以使硫代磷酸二乙酯结构更充分暴露,以刺激动物产生免疫应答. 此外,短手臂半抗原(H1)或含有不饱和双键的短手臂半抗原(H3)与长手臂半抗原相比,可以更好地刺激动物产生高质量抗体. 原因可能在于抗原手臂较长时,容

易发生弯曲而导致免疫效果下降<sup>[20-22]</sup>. 手臂中含有的不饱和双键使其具有较好的刚性结构, 不易自由旋转, 对于刺激动物免疫应答具有良好效果<sup>[23,24]</sup>. 而 PAb-H8 表现出较好的类特异性及高灵敏度, 原因可能在于取代在间位上的长手臂弯曲后恰好使得硫代磷酸二乙酯结构充分暴露, 从而更好地刺激动物免疫应答.

### 2.3 包被半抗原结构对 ELISA 灵敏度的影响

ELISA 模式中包被原和免疫原的半抗原结构不同被称为异源包被. 由于包被半抗原和免疫半抗原结构的差异, 抗体与包被原的结合能力减弱, 从而提高了待测物与抗体的竞争能力, 因此异源包被可以显著提高间接竞争 ELISA 方法的检测灵敏度<sup>[25,26]</sup>. 本研究将每个抗体在 8 个不同包被原包被条件下进行 ELISA 检测效果评价, 并选择同源包被和最佳异源包被条件下的  $IC_{50}$  进行对比分析. 表 3 结果显示, 在异源包被的情况下, ELISA 方法的检测灵敏度普遍大幅度提高, 特别是对蝇毒磷等 7 个药物的灵敏度提高了 5 倍以上, 其中, PAb-H1 以 H6-OVA 在异源包被的模式下其对待测药物的灵敏度提高最为明显, 对蝇毒磷、对硫磷、啮硫磷、三唑磷、除线磷、辛硫磷和甲拌磷 7 个药物的灵敏度均较高, 最低检测限分别达到 0.0002, 0.039, 0.003, 0.002, 0.004, 0.037 和 0.028 mg/L, 均能满足国内外相关有机磷药物最大允许残留限量标准 (MRLS) 的检测要求.

**Table 3 Indirect ELISA evaluation [ $IC_{50}/(mg \cdot L^{-1})$ ] for 12 analytes using homologous and heterologous coating antigens**

Pesticide	PAb-H1		PAb-H2		PAb-H3		PAb-H4	
	H1—OVA	H6—OVA	H2—OVA	H7—OVA	H3—OVA	H8—OVA	H4—OVA	H7—OVA
Coumaphos	1.017	0.013	3.152	0.112	0.061	0.023	0.329	0.126
Parathion	12.402	0.348	2.639	0.779	0.861	0.140	5.971	1.997
Quinalphos	8.395	0.022	25.318	0.816	3.916	2.077	20.567	4.261
Triazophos	6.442	0.035	34.766	0.420	4.000	0.878	45.466	5.493
Dichlofenthion	5.349	0.850	21.341	1.304	4.503	1.580	14.693	11.484
Phoxim	1.512	1.301	12.218	4.592	2.130	0.310	8.996	2.875
Phorate	19.644	0.751	39.496	2.928	20.084	6.073	10.318	1.286
Sulfotep	98.282	39.893	64.139	19.789	48.917	34.356	30.520	26.478
Diazinon	20.729	7.939	26.281	3.644	18.764	7.074	18.888	35.233
Isazofhos	82.812	14.257	53.316	15.671	40.008	39.170	35.628	23.417
Bromophos ethyl	28.230	24.873	47.860	13.291	14.023	12.373	19.030	23.833
Chlorpyrifos	18.072	13.484	50.856	50.201	26.442	62.424	36.707	27.094
Pesticide	PAb-H5		PAb-H6		PAb-H7		PAb-H8	
	H5—OVA	H8—OVA	H6—OVA	H7—OVA	H7—OVA	H5—OVA	H8—OVA	H3—OVA
Coumaphos	0.174	0.007	41.135	3.513	0.235	0.052	0.289	0.138
Parathion	0.349	0.642	4.452	1.184	3.576	1.974	2.102	0.642
Quinalphos	3.364	1.941	6.577	2.521	10.626	2.975	5.595	1.294
Triazophos	19.972	3.874	8.352	8.427	34.141	10.632	7.515	4.124
Dichlofenthion	2.491	2.040	1.857	1.266	6.473	6.706	4.761	1.437
Phoxim	5.540	1.443	7.545	5.604	2.139	2.024	2.852	2.123
Phorate	9.924	0.518	7.503	3.513	24.254	2.919	12.486	1.684
Sulfotep	7.975	3.812	26.162	25.182	31.577	4.194	43.689	36.872
Diazinon	15.313	9.964	36.424	1.696	29.199	13.821	27.402	54.834
Isazofhos	35.373	2.672	33.505	28.854	23.539	8.730	47.455	31.286
Bromophos ethyl	13.944	6.847	36.085	5.985	29.893	7.172	4.817	27.936
Chlorpyrifos	33.063	0.642	9.689	1.184	35.616	37.760	21.853	21.027

### 参 考 文 献

- [1] Sultatos L. G. . J. Toxicol. Env. Heal. A[J], 1994, **43**: 271—289
- [2] Miller J. K. , Lenz D. E. . J. Appl. Toxicol. [J], 2001, **21**: S23—S26
- [3] Berjani S. , Assadi Y. , Anbia M. , *et al.* . J. Chromatogr. A[J], 2006, **1123**: 1—9
- [4] Inoue S. , Saito T. , Mase H. , *et al.* . J. Pharm. Biomed. Anal. [J], 2007, **44**: 258—264
- [5] Kolosova A. Y. , Park J. H. , Eremin S. A. , *et al.* . Anal. Chim. Acta[J], 2004, **511**: 323—331

- [ 6 ] Farré M. , Kantiani L. , Barceló D. . Trac-Trend. Anal. Chem. [J] , 2007 , **26** : 1100—1112
- [ 7 ] Zhang Q. , Sun Q. , Hua B. , *et al.* . Food Chem. [J] , 2008 , **106** : 1278—1284
- [ 8 ] Spinks C. A. . Trends Food Sci. Tech. [J] , 2000 , **11** : 210—217
- [ 9 ] Banks J. N. , Chaudhry M. Q. , Matthews W. A. , *et al.* . Food Agric. Immunol. [J] , 1998 , **10** : 349—361
- [ 10 ] Johnson J. C. , Emon J. M. V. , Pullman D. R. , *et al.* . J. Agric. Food Chem. [J] , 1998 , **46** : 3116—3123
- [ 11 ] Alcocer M. J. C. , Dillon P. P. , Manning B. M. , *et al.* . J. Agric. Food Chem. [J] , 2000 , **48** : 2228—2233
- [ 12 ] Jang M. S. , Lee S. J. , Xue X. , *et al.* . Korean Chem. Soc. [J] , 2002 , **23** : 1116—1120
- [ 13 ] LIU Xian-Jin(刘贤进) , YAN Chun-Rong(颜春荣) , LIU Yuan(刘媛) , *et al.* . Scientia Agricultura Sinica(中国农业科学)[J] , 2008 , **41**(3) : 727—733
- [ 14 ] Trujillo-Ferrara J. , Correa-Basurto J. , Espinosa J. , *et al.* . Synth. Commun. [J] , 2005 , **35** : 2017—2023
- [ 15 ] Newman D. J. , Price C. P. . Ther. Drug Monit. [J] , 1996 , **18** : 493—497
- [ 16 ] LUO Ai-Lan(骆爱兰) , YU Xiang-Yang(余向阳) , ZHANG Cun-Zheng(张存政) , *et al.* . Scientia Agricultura Sinica(中国农业科学)[J] , 2005 , **38**(2) : 308—312
- [ 17 ] McAdam D. P. , Hill A. S. , Beasley H. L. , *et al.* . J. Agric. Food Chem. [J] , 1992 , **40** : 1466—1470
- [ 18 ] Manclús J. J. , Primo J. , Montoya A. . J. Agric. Food Chem. [J] , 1996 , **44** : 4052—4062
- [ 19 ] Singh K. V. , Jasdeep K. , Grish C. , *et al.* . Bioconjugate Chem. [J] , 2004 , **15** : 168—173
- [ 20 ] Kim Y. J. , Cho Y. A. , Lee H. S. , *et al.* . Anal. Chim. Acta[J] , 2003 , **475** : 85—96
- [ 21 ] Kim Y. J. , Cho Y. A. , Lee H. S. , *et al.* . Anal. Chim. Acta[J] , 2003 , **494** : 29—40
- [ 22 ] Liang Y. , Liu X. J. , Liu Y. , *et al.* . Anal. Chim. Acta[J] , 2008 , **615** : 174—183
- [ 23 ] Shen Y. D. , Zhang S. W. , Xiao Z. L. , *et al.* . Chinese Chem. Lett. [J] , 2007 : 1490—1492
- [ 24 ] Shen Y. D. , Zhang S. W. , Lei H. T. , *et al.* . Molecules[J] , 2008 , **13** : 2238—2248
- [ 25 ] Lee H. J. , Shan G. M. , Watanabe T. , *et al.* . J. Agric. Food Chem. [J] , 2002 , **50** : 5526—5532
- [ 26 ] Galve R. , Sanchez-Baeza F. , Camps F. , *et al.* . Anal. Chim. Acta[J] , 2002 , **452** : 191—206

## Design of Generic Haptens for *O,O*-Diethyl Phosphorothioate Pesticides and Recognition Properties of Antibodies

XIE Gui-Mian, SUN Yuan-Ming, XU Zhen-Lin, LI Yong-Xiang,  
LEI Hong-Tao, WANG Hong, SHEN Yu-Dong\*

(College of Food Science/Key Laboratory of Food Quality and Safety of Guangdong Province,  
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract** Class-specific polyclonal antibodies for *O,O*-diethyl phosphorothioate pesticides had been generated. A series of generic haptens were synthesized and coupled to bovine serum albumin(BSA) and ovalbumin(OVA) for immunogens and coating antigens, respectively. New Zealand rabbits were immunized with immunogens to obtain corresponding polyclonal antibodies. The effects of hapten structure on antibodies properties and hapten heterology on ELISA sensitivity were also investigated. The results show that haptens with simple spacer-arm can generate antibodies with desired properties, and hapten heterology can improve ELISA sensitivity significantly. The polyclonal antibody PAb-H1 shows high sensitivity to seven commonly used *O,O*-diethyl phosphorothioate pesticides in an indirect competitive ELISA using a heterologous coating antigen(H6-OVA). The 50% inhibition value(IC<sub>50</sub>) is 0.013 mg/L for coumaphos, 0.348 mg/L for parathion, 0.022 mg/L for quinalphos, 0.035 mg/L for triazophos, 0.751 mg/L for phorate, 0.850 mg/L for dichlofenthion and 1.301 mg/L for phoxim, respectively. And the limit of detection(LOD) is lower than MRLS of all the seven *O,O*-diethyl phosphorothioate pesticides in food and agricultural products. Thus, this indirect ELISA with high sensitivity can potentially be used to develop commercial ELISA kits for a sensitive and rapid detection of *O,O*-diethyl phosphorothioate pesticides residues.

**Keywords** Organophosphorus pesticide; Generic hapten; Heterology coating; Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

(Ed. : H, J, Z)