

乙氧基磷酸酯类有机磷农药单克隆抗体的制备与鉴定*

张丽杰 潘家荣**

(中国农业科学院农产品加工研究所, 农业部农产品加工与质量控制重点实验室, 北京 100193)

摘要 制备针对乙氧基磷酸酯类有机磷农药的单克隆抗体, 以此为基础建立该类农药的快速免疫筛选检测方法. 以二乙基磷酸乙酸为通用结构半抗原, 分别使之与牛血清白蛋白和鸡卵清蛋白共价偶联, 合成免疫原和包被原并对其进行结构鉴定. 偶联成功后的免疫原用于免疫 Balb/c 小鼠. 将免疫成功小鼠的脾细胞与小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 筛选能稳定分泌抗乙氧基磷酸酯类有机磷农药单克隆抗体的杂交瘤细胞株. 获得的小鼠腹水用辛酸-硫酸铵法纯化, 所得纯化抗体以琼脂双扩散法鉴定其免疫球蛋白类型, 间接竞争 ELISA 方法测定其对半抗原的灵敏度、特异性和亲和性. 结果表明, 该抗体分泌 IgG1 亚类的单克隆抗体, 且与二乙基磷酸乙酸的亲和性较高(1.4×10^7 L/mol), 所得抗体对毒死蜱、对硫磷、丙溴磷、氧化乐果、除线磷、二嗪农、溴硫磷、辛硫磷、啉硫磷、三唑磷等农药有特异性反应. 该检测技术可用于上述农药的快速定性或定量检测.

关键词 单克隆抗体, 广谱性, 有机磷农药, 酶联免疫

学科分类号 Q2, Q5, R15

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00050

有机磷农药(OPs)研制已有 70 年的历史, 种类多达数百, 在世界范围内被广泛使用, 我们常见的乐果、对硫磷、甲胺磷、马拉硫磷等都属于这类农药. 有机磷农药也是我国使用量最大的农药, 产量占全国农药总量的一半以上^[1]. 尽管大多数 OPs 显示出较低的环境持久性, 但近几年, 急性中毒事件时有发生且呈明显上升趋势^[2]. 尤其是在生长期短、害虫多, 因此施药量大且多混配多种农药以增强杀虫效果的果蔬生产中, 有机磷农药残留超标问题更为严峻^[3].

高效、经济的快速检测技术可有效监察有机磷农药残留超标情况, 进而为消费者健康提供保障. 目前用于检测 OPs 多残留的方法主要有仪器分析法(如色谱、波谱、色质联用等)、免疫检测法等. 仪器检测法虽然灵敏度高, 但成本高、劳动强度大、样品前处理复杂、需要熟练的技术人员在专业实验室操作, 难以满足快速、经济地进行现场实时检测或样品大批量筛选的要求^[4]. 免疫分析方法基于抗原与抗体间的特异性反应, 灵敏度高、检测快速、操作简便, 可用于现场检测或色谱检测前的初

步筛选. 但传统的酶联免疫分析多只针对单一农药, 虽然凸显了免疫检测法在高特异性方面的优势, 但也限制了其检测范围. 以多种有机磷农药分子中共有官能团作为目标抗原决定簇设计通用人工抗原, 继而制备能识别含有这种共有结构的一类有机磷农药的单克隆抗体, 建立可用于多残留分析的免疫检测法不仅保持了免疫分析法高灵敏度和高特异性的优势, 还可突破传统免疫检测法的瓶颈, 拓展其检测范围. 基于此, 在对多种有机磷农药的分子结构进行分析比较后, 以二乙氧基磷酸基团作为目标抗原决定簇, 合成并鉴定了人工抗原, 并通过细胞融合、克隆化筛选出了 2 株能够稳定分泌针对该通用结构的单克隆抗体的细胞株 MOZ-1、MOZ-2, 并对两种抗体的性能进行了研究.

* 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2006AA10Z449).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62815875, E-mail: panjr@263.net

收稿日期: 2010-03-18, 接受日期: 2010-06-07

1 材料与方法

1.1 实验材料与主要试剂

1.1.1 细胞株. 鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 由本实验室保存.

1.1.2 动物. 雌性 Balb/c 鼠(7~8 周龄, 体重 20~22 g)购自北京兴隆实验动物养殖场.

1.1.3 主要试剂. 二乙基磷酸乙酸(Sigma 公司); 毒死蜱、对硫磷、甲基对硫磷、乙酰甲胺磷、乐果均购自国家农药质量监督检验中心, 纯度 99% 以上.

1.2 人工抗原的制备与鉴定

以半抗原(Hapten)二乙基磷酸乙酸的羧基为活性位点, 使之与 BSA 分别通过活性酯法、碳化二亚胺法和混合酸酐法合成三种免疫原. 包被原合成则采用混合酸酐法使半抗原与载体蛋白卵白蛋白(OVA)偶联获得.

1.2.1 免疫原合成(混合酸酐法, MAH). 参考 Gendloff 等^[9]和梁颖等^[10]的方法, 将 200 mg 半抗原溶于 10 ml 四氢呋喃, 加 130 μ l 三正丁胺, 冰水混合物中冷却至 0℃ 后逐滴加入 160 μ l 氯甲酸异丁酯. 冰浴搅拌 1 h, 所得反应液缓慢加入到 40 ml 10 g/L BSA 硼酸缓冲液中, 4℃ 搅拌反应过夜, 次日离心, 4℃ 条件下在磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)透析过夜 3 天, 每天换液 2~3 次. 透析液 3 000 r/min 离心 10 min 后, 收集上清液, 冻干保存.

1.2.2 包被原合成(活性酯法, NHS-DCC). 参照刘贤进等^[11]的方法, 称取 200 mg 半抗原和 115 mg N-羧基琥珀酰亚胺酯(NHS)于玻璃皿中, 5 ml 四氢呋喃溶解混合物, 磁力搅拌下向混合溶液中逐滴加入 5 ml 溶有 340 mg 二环己基碳二亚胺(DCC)的四氢呋喃, 室温下搅拌 2 h 后 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 缓慢加入到 40 ml 10 g/L 的 OVA 硼酸缓冲液中, 室温下磁力搅拌 2 h, 次日离心、透析、冻干如 1.2.1.

1.2.3 人工抗原的鉴定. 透析后的样品用紫外扫描仪进行 200~400 nm 波长扫描, 鉴定偶联状况(图 1). 得到各物质的特征吸收峰, 并根据特征吸收峰处的吸光值, 依照朗波比尔定律估算人工抗原的偶联比:

$$\varepsilon = A / (c \cdot L)$$

其中: ε 为某一物质的摩尔消光系数; A 为某

一物质在一定浓度下的紫外线吸收峰值; c 为摩尔浓度; L 为石英皿厚度($L=1$ cm).

并对半抗原、BSA、OVA、免疫原(H-BSA)、包被原(H-OVA)进行 ^{31}P NMR 谱扫描对偶联效果进行确证.

1.3 免疫动物

人工抗原生理盐水溶液与弗氏完全佐剂等量混合, 完全乳化后腹部皮下及足部多点注射, 免疫 6~8 周龄 Balb/c 雌性小鼠, 制备抗血清. 免疫选用高低剂量分别为 80 μ g 每 0.2 ml 和 5 μ g 每 0.2 ml. 一个月后改用弗氏不完全佐剂作为乳化剂, 以相同的剂量和方法进行加强免疫. 每 3 周一次, 共免疫 5 次.

1.4 单克隆抗体制备及鉴定

1.4.1 细胞融合. 融合前 10 天左右复苏 SP2/0 细胞, 传代培养, 使其保持在生命力旺盛的对数生长期. 取抗血清效价最高(2.5×10^4)的小鼠于融合前 3 天进行尾静脉冲击免疫. 摘除小鼠脾脏, 在 200 目不锈钢网上研磨制得脾细胞悬液并计数. 融合时将脾细胞与 SP2/0 细胞按 7.5:1 的数量比混合, 并在 PEG4000 的作用下进行融合. PEG4000 一般要在 30 s 内滴完, 30 s 轻摇融合细胞使其混匀, 再静置 90 s. 最后, 在 2 min 内由慢到快向前述融合细胞中不断滴加 15 ml RPMI-1640 培养液以终止融合反应. 1 000 r/min 离心 9 min, 所得细胞沉淀用适量 HAT 培养液制成细胞悬液, 0.1 ml 每孔加入到铺有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中. 7 天后用 HAT 半量换液, 3 天后换 HT 培养液. 一周后间接 ELISA 检测各培养孔的阳性孔^[8].

1.4.2 杂交瘤细胞株的建立. 将阳性孔细胞转入 24 孔板扩大培养, 待其长至孔底 1/3 时检测, 用有限稀释法^[8]对阳性孔进行克隆化. 10 天后间接 ELISA 检测阳性孔. 阳性孔再转入 24 孔板扩大培养, 待长至一定程度冻存一批, 剩余细胞转至培养瓶中. 待细胞铺满瓶底, 接种至小鼠腹腔扩大培养.

1.4.3 腹水扩大培养. 给小鼠腹腔注射液体石蜡, 一周后将杂交瘤细胞接种到小鼠体内, 0.5 ml/只 (约含 1×10^6 个杂交瘤细胞). 14 天左右可见小鼠腹部明显变大, 剪开皮毛、腹膜, 抽取腹水, 3 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清待纯化.

1.4.4 单克隆抗体的纯化. 采用辛酸硫酸铵沉淀法^[12]除去杂蛋白, 而后过 Protein A 柱子纯化 IgG,

经紫外分光光度法测定蛋白质含量，蛋白质浓度 $/(g/L)=[1.45 A_{280}-0.74 A_{260}] \times \text{稀释倍数}$

1.4.5 单抗的特性鉴定.

主要对抗体亚类、亲和常数、特异性及与其他农药的交叉反应率进行测定.

琼脂双扩散法鉴定亚类：将杂交瘤细胞培养上清液离心后浓缩待测，将待测液与标准的兔抗小鼠 IgA、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b 及 IgG3 抗体进行双向免疫扩散实验.

Beatty 等^[10]方法测定亲和常数：经方阵滴定试验确定抗原 - 抗体的最佳工作浓度，并在最佳工作条件下测定亲和常数.

特异性：最佳工作条件下，分别对毒死蜱、对硫磷、辛硫磷、二嗪农、甲基对硫磷、氧化乐果、乐果、甲胺磷等 16 种有机磷农药进行交叉反应试验^[11]. 将上述农药按一定浓度梯度稀释，建立它们的抑制标准曲线，并计算各自的 IC_{50} ，代入公式计算交叉反应率. 交叉反应率 $= [IC_{50}(\text{二乙基磷酸乙酸}) / IC_{50}(\text{二乙基磷酸乙酸及其他农药})] \times 100\%$

2 结 果

2.1 人工抗原鉴定

图 1a、图 1b 分别是免疫原(H-BSA)和包被原(H-OVA)的紫外图谱，由图 1a可看出：半抗原在 204 nm 处有最大吸收峰，BSA 在 220、278 nm 处有明显吸收峰，H-BSA 则在 215 nm 有最大吸收峰，较半抗原在 204 nm 的最大吸收峰发生前移，且在 BSA 的特征吸收位置(278 nm 处)出现了明显吸收峰. H-BSA 的紫外吸收光谱明显区别于半抗原和 BSA 的紫外吸收光谱，由此可以初步推断 BSA 的某些基团已被修饰，但依然保留着载体蛋白的性质，即半抗原已经偶联到 BSA 上. 根据上述推测方法，可以确定图 1b 中 H-OVA 也成功偶联. 根据朗波比尔定律计算得 H-BSA 和 H-OVA 的摩尔浓度分别为： 2.846×10^{-3} 、 $2.133 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$. 即 1 mol BSA 或 OVA 上分别连接了 2.846×10^3 、 $2.133 \times 10^3 \text{ mol}$ 的半抗原分子，可用于免疫动物.

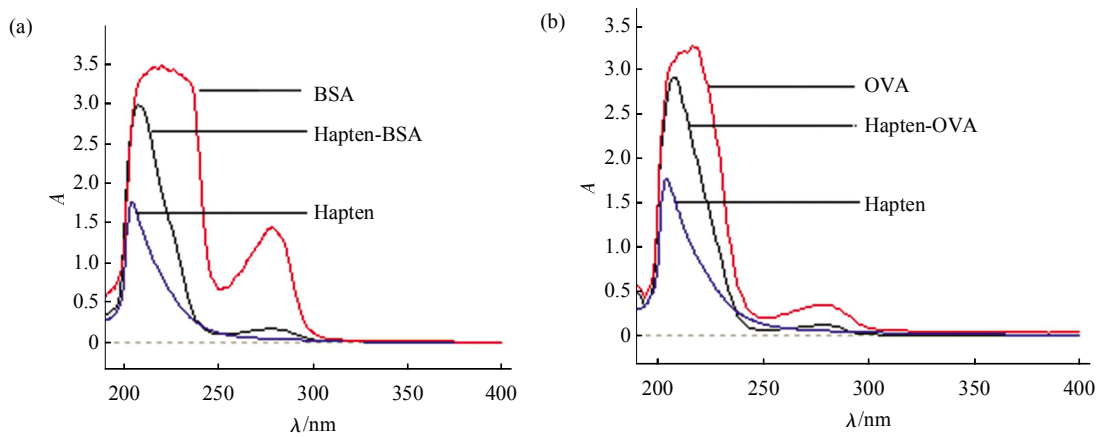


Fig. 1 UV spectrum of artificial immunogen (a) and artificial coating antigen (b)

对照表 1 中 Hapten、BSA、OVA、H-BSA、H-OVA 在 NMR ^{31}P 谱中的化学位移可以看出：载体蛋白 BSA 和 OVA 中因不含有磷元素，在其 NMR ^{31}P 谱中无特征吸收峰未被检出. 偶联物

H-BSA、H-OVA 有 P 元素的特征吸收峰出现，且出峰位置较 Hapten 特征峰的化学位移都有明显的偏移，可进一步证明人工抗原偶联成功.

Table 1 Chemical shift (δ) of hapten, carrier protein and conjugate in ^{31}P NMR spectrum

	Hapten	BSA	OVA	H-BSA	H-OVA
δ	21.56	—	—	2.48	2.43

“—” as not found.

2.2 杂交瘤细胞株的建立

取效价最高小鼠的脾脏进行细胞融合, 其中细胞融合率为 63%, 阳性孔 6 个, 阳性率约为 2%, 对筛选出的阳性孔细胞进行间接 ELISA 和竞争 ELISA, 挑选出吸光度值较高、抑制效果较明显的阳性孔细胞进行有限稀释, 以获取单克隆细胞, 最终得到 2 株能稳定分泌抗体的单克隆杂交瘤细胞

株, 分别命名为 MOZ-1 和 MOZ-2. 间接 ELISA 检测 2 株单克隆杂交瘤细胞结果表明(表 2): 分别以 H-OVA、BSA 和 OVA 包被酶标板, 2 株杂交瘤细胞的培养上清与载体蛋白 BSA 和 OVA 反应均为阴性, 故上清液中不含抗 BSA 或抗 OVA 的抗体; 但上清液与 H-OVA 呈阳性反应, 表明上清液中含有针对半抗原的抗体.

Table 2 Titers of McAbs in culture supernatant determined by indirect ELISA

Cell strain	Coating antigens			Titers
	BSA	OVA	H-OVA	
MOZ-1	-	-	+	2.5×10^5
MOZ-2	-	-	+	2.0×10^5

“+” as positive; “-” as negative.

2.3 单克隆抗体的纯化

CA-AS 沉淀法纯化后: 将 50 μ l 抗体溶液用 PBST 稀释成 2 ml 后, 用紫外分光光度计测定在抗体稀释液 260 nm 及 280 nm 处的吸光度分别为 0.173 和 0.096, 因此, 经纯化浓缩后抗体浓度为 $(0.173 \times 1.45 - 0.096 \times 0.74) \times (2000/50) = 7.20$ (g/L), 回收率(Recovery) = $(7.20/10.06) \times 100\% = 71.6\%$. 即: CA-AS 法对腹水中单克隆抗体的回收率较高.

2.4 抗体特异性测定

对抗体进行 Ig 亚类鉴定, 鉴定结果为 IgG1.

按 Beatty 的方法计算, 单抗的亲数和常数为 1.4×10^7 , 抗体对半抗原有较强的亲和力.

方阵滴定法挑选 A 值在 1.0 左右的抗原抗体浓度组合作为间接 ELISA 实验的最佳工作浓度. 此时, 包被抗原浓度为 10 mg/L, 抗体浓度为 0.2 mg/L. 在此条件下, 以各农药的对数浓度为横坐标, 抑制率为纵坐标, 建立各农药的间接竞争 ELISA 标准曲线, 其中:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照孔 A 值} - \text{不同半抗原浓度孔 A 值}}{\text{对照孔的 A 值}} \times 100\%$$

分别求出半抗原(或其他农药)在抑制率为 50% 时的浓度, 即半数抑制浓度(IC_{50}), 并计算交叉反应率.

由图 2 中建立的回归方程可算得半抗原对腹水纯化单抗的半数抑制浓度(IC_{50})约为 0.22 mg/L, 最低检测限(IC_{10}) 约为 0.38 μ g/L, 以单克隆抗体为基础建立的 ELISA 方法的线性检测范围在 28.07 mg/L ~ 1.9 μ g/L.

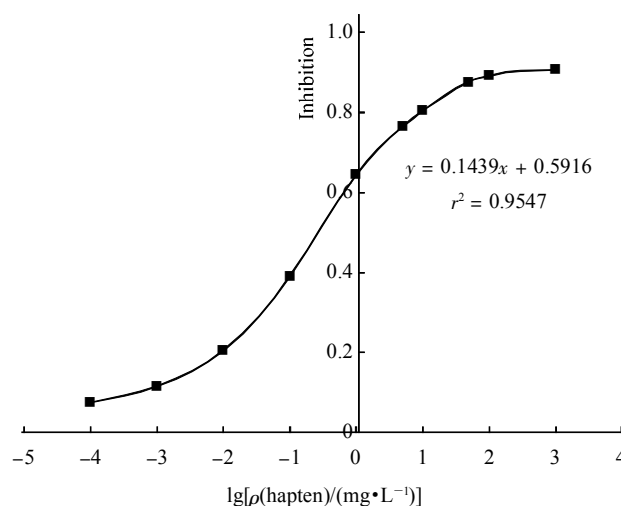


Fig. 2 Inhibitory reaction curve of hapten

由图 3 可知, 所得抗体对多种农药产生了识别反应, 其中, 抗体对毒死蜱、对硫磷、丙溴磷、氧化乐果、除线磷、二嗪农、溴硫磷、辛硫磷、啶硫磷、三唑磷等农药的交叉反应率(CR)较高, 对甲胺磷、水胺硫磷、乐果、甲基对硫磷、稻丰散、马拉硫磷等的 CR 较低, 甚至未能检出($IC_{50} > 100$ mg/L). 通过比较分析两类农药的分子结构发现(表 3), 除氧化乐果外, CR 较高的农药都共有半抗原分子中的 C_2H_5O- 结构, 可以推测 C_2H_5O- 作为一个抗原决定簇对免疫反应起着非常重要的作用. 抗体在乐果和氧化乐果之间的选择性差异较大, 氧化乐果中虽不存在 C_2H_5O- 结构, 但 IC_{50} 约为 0.71 mg/L, CR

高达 31%，而与之在结构上只存在 $\text{P}=\text{O}$ 和 $\text{P}=\text{S}$ 键不同的乐果则未能被检出，这说明 $\text{P}=\text{O}$ 也是刺激免疫反应发生的一个重要抗原决定簇。此外，抗体对含有一个 $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-$ 和一个 $\text{P}=\text{O}$ 的丙溴磷的识别明显优于含有二个 $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-$ 而其余结构类似的除线磷，也证明了 $\text{P}=\text{O}$ 作为抗原决定簇之一的重要

作用；除线磷的 $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-$ 与 $\text{P}=\text{S}$ 同交叉反应最强的毒死蜱一样，两者间显著的交叉反应率差异可能是在毒死蜱吡啶结构中氮原子的高电负性使得 π 电子云大大地偏向氮原子，吡啶环上其他碳原子电子云密度相对于苯电子云密度减小，较低电子云密度更有利于抗原决定簇显露。

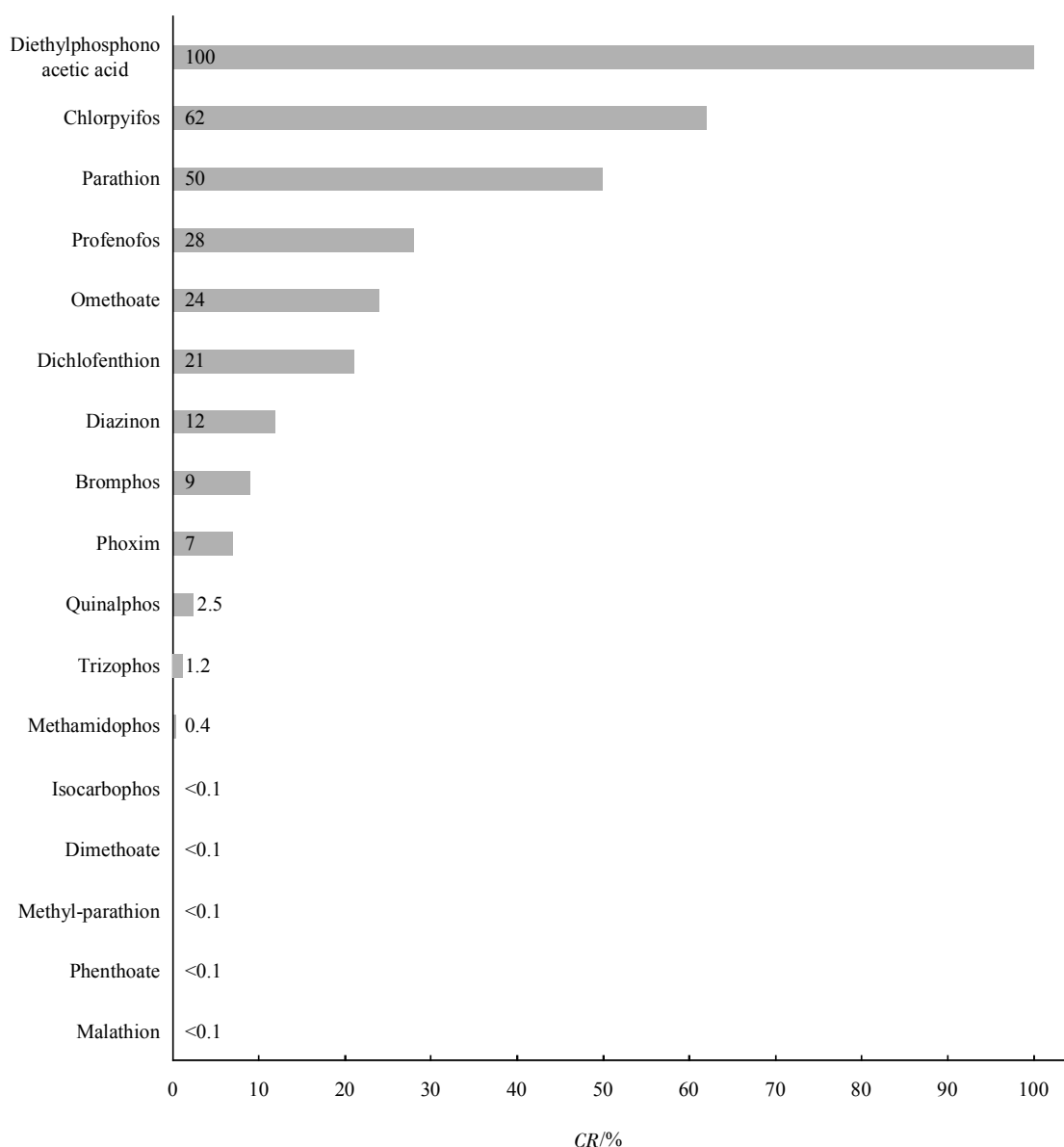


Fig. 3 ELISA cross-reactions with different organophosphorous pesticides using the monoclonal antibody

Table 3 Chemical structural formula of 16 organophosphorous pesticides used in ELISA cross-reactions

$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{H}_2-\text{O} \diagup \\ \text{H}_3\text{C}-\text{H}_2-\text{O} \diagdown \end{array} \text{P} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_2-\text{C}-\text{OH} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ Diethylphosphono acetic acid	
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O} \diagup \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O} \diagdown \end{array} \text{P} \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{O} \begin{array}{c} \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{Cl} \quad \text{Cl} \end{array}$ Chlorpyrifos	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O} \diagup \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O} \diagdown \end{array} \text{P} \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{O} \text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ Parathion
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O} \diagup \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S} \diagdown \end{array} \text{P} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{O} \text{C}_6\text{H}_3\text{ClBr}$ Profenofos	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{O} \diagup \\ \text{H}_3\text{C}-\text{O} \diagdown \end{array} \text{P} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{S}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_3$ Omethoate
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{H}_2-\text{O} \diagup \\ \text{H}_3\text{C}-\text{H}_2-\text{O} \diagdown \end{array} \text{P} \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{O} \text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_2$ Dichlofenthion	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O} \diagup \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O} \diagdown \end{array} \text{P} \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{O} \text{C}_5\text{H}_4\text{N}_2\text{CH(CH}_3)_2$ Diazinon
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O} \diagup \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O} \diagdown \end{array} \text{P} \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{O} \text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_2\text{Br}$ Bromophos	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O} \diagup \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O} \diagdown \end{array} \text{P} \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{O}-\text{N}=\text{C}(\text{C}\equiv\text{N})\text{C}_6\text{H}_5$ Phoxim
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O} \diagup \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O} \diagdown \end{array} \text{P} \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{O} \text{C}_{10}\text{H}_6\text{N}_2$ Quinalphos	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O} \diagup \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O} \diagdown \end{array} \text{P} \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{O} \text{C}_5\text{H}_4\text{N}_3\text{C}_6\text{H}_5$ Trizophos
$\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{P} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{NH}_2 \\ \text{S}-\text{CH}_3 \end{array}$ Methamidophos	$\text{CH}_3\text{O}-\text{P} \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{NH}_2 \end{array} \text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{COOCH(CH}_3)_2$ Isocarbophos
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{O} \diagup \\ \text{H}_3\text{C}-\text{O} \diagdown \end{array} \text{P} \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{S}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_3$ Dimethoate	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{O} \diagup \\ \text{H}_3\text{C}-\text{O} \diagdown \end{array} \text{P} \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{O} \text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ Methyl-parathion
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{O} \diagup \\ \text{H}_3\text{C}-\text{O} \diagdown \end{array} \text{P} \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{S}-\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ Phenthoate	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{O} \diagup \\ \text{H}_3\text{C}-\text{O} \diagdown \end{array} \text{P} \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{S}-\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ Malathion

3 讨 论

有机磷农药多为磷酸酯类或硫代磷酸酯类^[12],

其基本化学结构为:
$$\begin{array}{c} \text{Y} \\ \parallel \\ \text{X}-\text{P} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{O}-\text{R} \quad \text{O}-\text{R}' \end{array}$$
, 式中 R 和 R' 多

为甲氧基(CH₃O—)或乙氧基(C₂H₅O—), Y 为氧(O)或硫(S)原子, X 为烷基、共轭双键、芳香族或其他取代基团. 本试验设计的目标决定簇是位于载体蛋白远端、暴露在外部的特征基团, 即 C₂H₅O—和 P=O. 为了突出半抗原的特征结构——“决定簇”, 避免复杂极性结构如苯环等影响免疫系统对决定簇的识别^[13], 决定簇与偶联位点羧基间的连接臂是一个亚甲基结构. 相较于 Alcocer 等^[14]、Ward 等^[15]选取的具有共轭双键结构的二乙基磷酸丁烯酸和 Xu 等^[16]设计合成的含有苯环的半抗原, 二乙基磷酸乙酸的 X 为烷基, 在结构上更具有普遍性, 因此检测范围可能更广泛. 而且, 二乙基磷酸乙酸本身含有的羧基可以直接作为与载体蛋白偶联的位点, 无需如 Banks 等^[17]设计的半抗原——O, O-二甲基-S-丁醇基磷酸酯那样, 还需先将羟基衍生化为羧基方能与载体蛋白偶联, 这大大缩短了人工抗原合成的时间, 也降低了劳动强度.

设计有机磷农药类通用结构半抗原, 制备具有广谱检测性抗体的先河由 Sudi 等^[18]于 1988 年开启. Sudi 等制备的广谱抗体可检测数种有机磷农药, 更重要的是他验证了通过化学结构分析, 合成通用半抗原, 并以此为基础免疫动物获得可用于有机磷农药多残留检测抗体思路的可行性. 稍后, Alcocer 等^[14]利用多克隆抗体的复杂性产生交叉反应, 使可检测有机磷农药种类增加到 10 种以上, 还将其应用于传感器分析, 有效提高了检测灵敏度, 取得较好的效果. Wolter^[19]、Banks^[17]、Ward^[15]、Xu^[16]、薛小平^[20]、刘贤进^[7]等也通过设计不同半抗原制备广谱抗体在有机磷农药多残留检测方面取得了不同程度的进展. 但上述研究多以多克隆抗体的交叉反应为基础, 与单克隆抗体相比, 多克隆抗体存在特异性与灵敏度低、大批量再生产和保存困难等问题. 本实验筛选除了能够稳定分泌通用结构单克隆抗体的细胞株, 以所得单克隆抗体为基础建立的 ELISA 方法的检测范围为(0.38×10⁻³~0.22) mg/L, 可以较好地识别筛选具有(C₂H₅O—)₂-P(O 或 S)—O 结构的多种有机磷农药, 这对于有机磷酶联免疫

测定方法的建立和快速检测试剂盒的推广实用具有重要的意义. 此外, 单克隆细胞株的建立也为基因改造多价抗体, 进一步提高抗体的亲和性、灵敏度奠定了基础.

当前, 发达国家凭借其技术优势对进口农产品制定苛刻的“绿色标准”, 其中果蔬遭遇的“绿色壁垒”最为常见, 如: 美国对新鲜蔬菜的农药残留限量制定了 98 种农药 620 个限量标准, 对进口苹果的检验有 102 项残留; 日本于 2006 年 5 月 29 日开始实施的“肯定列表制”对进口食品、农产品中可能出现的 799 种农药、兽药和饲料添加剂设定了 5 万多个暂定限量标准. 这些都严重影响了我国果蔬产品的正常出口贸易. 本实验中探讨的有机磷农药广谱免疫检测试剂盒在经过相关性优化后, 可以对果蔬等农产品中的有机磷农药残留总量进行经济、快速、实时地生产监测, 从而达到产品初筛, 在一定程度上降低产品检测成本和规避产品农残超标风险的目的.

参 考 文 献

- [1] 马 瑾, 潘根兴, 万洪富, 等. 有机磷农药的残留、毒性及前景展望. 生态环境, 2003, 12(2): 213-215
Ma J, Pan G X, Wan H F, et al. Ecology and Environment, 2003, 12(2): 213-215
- [2] 刘 萍, 张进忠. 有机磷农药残留检测技术进展. 环境污染与防治, 2006, 28(1): 55-57
Liu P, Zhang J Z. Environmental Pollution and Control, 2006, 28(1): 55-57
- [3] 殷祥刚, 尹丽梅, 胥传来. 有机磷农药多残留免疫分析方法研究进展. 食品科学, 2008, 29(10): 684-688
Yin X G, Yin L M, Xue C L. Food Science, 2008, 29(10): 684-688
- [4] 刘 慧, 闫树刚, 朱 力. 食品中农药残留快速检测方法的研究. 中国农学通报, 2003, 19(4): 138-141
Liu H, Yan S G, Zhu L. Chin Agriculture Sci Bull, 2003, 19(4): 138-141
- [5] Gendloff E H, Casale W L, Ram B P, et al. Hapten-protein conjugates prepared by the mixed anhydride method cross-reactive antibodies in heterologous anti-sera. J Immuno Meth, 1986, 92(1): 15-20
- [6] 梁 颖, 刘 媛, 祝金凤, 等. 甲氧基有机磷广谱多抗的制备. 分析化学, 2008, 36(5): 647-652
Liang Y, Liu Y, Zhu J F, et al. Chin J Anal Chem, 2008, 36(5): 647-652
- [7] 刘贤进, 颜春荣, 刘 媛, 等. 有机磷杀虫剂通用结构半抗原的设计及广谱特异性抗体的制备. 中国农业科学, 2008, 41(3): 727-733
Liu X J, Yan C R, Liu Y, et al. Sci Agricultura Sin, 2008, 41(3):

- 727-733
- [8] 吴雅欣, 许园园, 潘家荣. 毒死蜱单克隆抗体的制备及鉴定. 核农学报, 2009, **23**(2): 341-344
Wu Y X, Xu Y Y, Pan J R. J Nuclear Agricultural Sci, 2009, **23**(2): 341-344
- [9] 陈伯权, 吴美英, 叶群瑞. 几种部分纯化单克隆抗体方法的比较. 病毒学报, 1990, **6**(2): 122-126
Chen B Q, Wu M Y, Ye Q R. Chin J Virol, 1990, **6**(2): 122-126
- [10] Beatty J D, Beatty B G, Vlahos W E. Measurement of monoclonal anti-body affinity by non-competitive enzyme immunoassay. Immunol Methods, 1987, **100**(12): 173-179
- [11] Leif Bruun, Claus Koch, Mogens H J, *et al.* A new monoclonal antibody for the sensitive detection of cyanazine and other s-triazines in water by ELISA. Food and Agricultural Immunology, 2000, **4**(12): 253-262
- [12] 殷祥刚, 尹丽梅, 胥传来. 有机磷农药多残留免疫分析方法研究进展. 食品科学, 2008, **29**(10): 684-688
Yin X G, Yin L M, Xue C L. Food Sci, 2008, **29**(10): 684-688
- [13] 张文元, 杨亚冬. 农药小分子半抗原合成的研究与应用. 农药研究与应用, 2007, **11**(6): 7-10
Zhang W Y, Yang Y D. Agrochemicals Research and Application, 2007, **11**(6): 7-10
- [14] Alcocer M J C, Dillon P, Manning B M, *et al.* Use of phosphonic acid as a generic hapten in the production of broad specificity anti-organophosphate pesticide antibody. Agric Food Chem, 2000, **48**(6): 2228-2233
- [15] Ward C M, Willkinson A P, Lee H A. Monoclonal anti-idiotypic antibody mimicking the pesticide binding site cutinase: potential for broad specificity in organophosphate recognition. J Immuno Meth, 1999, **224**(1-2): 197-202
- [16] Xu Z L, Xie G M, Li Y X, *et al.* Production and characterization of a broad-specificity polyclonal antibody for O,O-diethyl organophosphorus pesticides and a quantitative structure- activity relationship study of antibody recognition. Analytica Chimica Acta, 2009, **647**(1): 90-96
- [17] Banks J N, Chaudhry M Q, Matthews W A, *et al.* Production and characterization of polyclonal antibodies to the common moiety of some organophosphorous pesticides and development of a generic type ELISA. Food and Agric Immunology, 1998, **4**(10): 349-361
- [18] Sudi J, Heesch W. Studies on the development of an immune-assay for group-specific detection of the diethyl ester of phosphates, thiophosphates, dithiophosphates and phosphonates. Kieler Milchwiet Shaft Liche Forschung, 1988, **4**(3): 179-203
- [19] Wolter T H, Hanks W, William T J, *et al.* Syntheses of hapten containing dioxaphosphorinan methoxyacetic organophosphate pesticides. Bioconjugate Chemistry, 1997, **8**(3): 257-266
- [20] 薛小平, 张美顺, 李荣源, 等. 高亲和力抗有机磷杀虫剂单克隆抗体的制备与鉴定. 中国生物工程杂志, 2003, **23**(6): 68-71
Xue X P, Zhang M S, Li R Y, *et al.* China Biotechnology, 2003, **23**(6): 68-71

Preparation and Identification of a Monoclonal Antibody Specific to a Broad Spectrum of O, O-diethyl Organophosphorus Pesticides*

ZHANG Li-Jie, PAN Jia-Rong**

*(Institute of Agro-Food Science and Technology, CAAS/Key Laboratory of Agro-Food Processing and Quality Control,
Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China)*

Abstract The objective of this study was to develop an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with specific monoclonal antibodies for quick detection and screening of a broad spectrum of O,O-diethyl organophosphorus pesticides. Diethylphosphono acetic acid was used as a hapten and conjugated with bovine sera albumin (BSA) or ovalbumin (OVA) to prepare immunogen and coating antigen, respectively. Two hybridoma cell lines that produce monoclonal antibodies against organophosphorus pesticides have been obtained by fusing mouse myeloma cells SP2/0 and splenocytes from Balb/c mice immunized with the immunogen. The immunoglobulin class was analyzed by double immunodiffusion and the affinity and specificity of McAbs were determined with indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results indicated that the immunoglobulin class of McAb was IgG1, McAbs have a high affinity for diethylphosphono acetic acid (1.4×10^7 L/mol) and are able to cross-react to Chlorpyrifos, Parathion, Profenofos, Omethoate, Dichlofenthion, Diazinon, Bromophos, Phoxim. This immunoassay is therefore capable of detecting 8 different organophosphorus pesticides. It is concluded that this assay is a qualified screening tool for quantitative or semi-quantitative detection of the 8 organophosphorus pesticides.

Key words monoclonal antibody, broad spectrum, organophosphorous pesticides, ELISA

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00050

*This work was supported by a grant from Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA10Z449).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62815875, E-mail: panjr@263.net

Received: March 18, 2010 Accepted: June 7, 2010