

倍硫磷半抗原、人工抗原的合成和鉴定

肖治理, 王弘, 沈玉栋, 雷红涛, 吴青, 杨金易, 孙远明

(广东省食品质量安全重点实验室, 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 为研究建立有机磷农药倍硫磷的免疫分析法, 合成了 1 种倍硫磷半抗原和 2 种人工抗原。采用改进的方法将三氯硫磷与 3-甲基-4-甲硫基苯酚、β-丙氨酸反应制备了倍硫磷半抗原, 产物经薄层层析、¹H-NMR 和质谱鉴定为预期产物。分别将半抗原以活泼酯法、混合酸酐法与 BSA、OVA 偶联制备了人工抗原 BZB 和 BGO, 通过紫外光谱鉴定证明偶联成功。用 TNBS 比色法测定了 BZB、BGO 与载体蛋白的克分子结合比, 分别为 29:1 和 12:1。以 BZB 为免疫原免疫 Balb/c 小鼠, 以 BGO 为包被抗原对小鼠血清进行间接竞争 ELISA 分析表明, 小鼠经免疫后产生了针对倍硫磷的特异性抗血清, 从而进一步证明抗原合成成功。本方法为研究建立倍硫磷的免疫分析方法奠定了基础。

关键词: 倍硫磷; 半抗原; 人工抗原; 免疫分析

文章编号: 1673-9078(2012)8-975-978

Synthesis and Identification of Hapten and Artificial Antigens of Fenthion

XIAO Zhi-li, WANG Hong, SEHN Yu-dong, LEI Hong-tao, WU Qing, YANG Jin-yi, SUN Yuan-ming

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

Abstract: In order to develop immunoassays to fenthion, an organophosphorus pesticide, one fenthion hapten and two artificial antigens were synthesized before antibody production. The fenthion hapten was produced by combining thiophosphoryl chloride with 3-methyl-4-methylthiophenol and β-alanine. The production was identified through TLC, ¹H-NMR and MS. The hapten was conjugated to bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) by the active ester method and the mixed anhydride method, respectively. The products, named as BZB and BGO, were identified through ultraviolet spectrum (UV). A spectrophotometric method using 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) was performed to estimate hapten to carrier protein ratio. The results showed that the binding rates of BZB and BGO came to 29:1 and 12:1, respectively. Balb/C mice were immunized with BZB and competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) indicated the existence of specific antibodies in the antisera which further verified the success of synthesis.

Key words: fenthion; hapten; artificial antigen; immunoassay

硫磷 (fenthion, 又名百治屠) 是一种高效、广谱有机磷杀虫剂, 化学名为 O,O-二甲基-O-(3-甲基-4-甲硫基苯基)硫代磷酸酯, 分子量 278, 纯品为无色液体, 难溶于水, 易溶于多种有机溶剂。倍硫磷 (结构式见图 1) 属中等毒性, 对多种害虫有药效, 主要是触杀和胃毒作用, 用于蔬菜、水稻、棉花、果树等。对人畜易经皮肤及消化道吸收, 对家畜毒性较大, 具有蓄积性, 有轻度胚胎毒作用, 其中毒潜伏期长, 症状易反复, 病程长^[1]。

收稿日期: 2012-05-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30901005); 广东省食品安全应急检测技术研究中心项目 (2010A032000001-4); 广东省教育部产学研结合项目 (2011A090200029、2010A090200084)

作者简介: 肖治理 (1978-), 女, 博士, 讲师, 从事食品安全快速检测技术研究

通讯作者: 孙远明

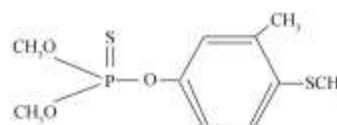


图 1 倍硫磷的结构式

Fig.1 Structure of fenthion

检测倍硫磷的方法主要有气相色谱、化学发光、免疫分析等^[2-4]。免疫分析方法具有简便、快速、灵敏和高通量的优点, 特别适合用于现场快速检测。

人工抗原的合成是制备抗体和建立免疫分析方法的关键步骤, 而半抗原的设计合成又是合成人工抗原的前提。倍硫磷属于芳香族有机磷酸酯, 其分子结构中带有苯环, 而苯环部分是区别不同农药品种的特征结构。如果要制备倍硫磷的特异性抗体, 宜从磷酸酯部分进行衍生、偶联, 这样可以最大限度地暴露其特征苯环结构, 从而使制备的抗体特异性更好^[5,6]。Kim 等^[7]人和 Zhang 等^[8]采用无水甲醇作为反应介质, 将

三氯硫磷与 3-甲基-4-甲硫基苯酚、直链氨基酸反应合成了倍硫磷半抗原, 反应在非水相中进行, 且两步反应之间要经过柱层析进行纯化和浓缩, 操作较为复杂。

本研究采用改进的方法合成倍硫磷半抗原, 进而制备其人工完全抗原, 并免疫动物制备抗血清, 以期研究建立水胺硫磷的免疫分析方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

三氯硫磷 (95%), 广东江门农药厂; 3-甲基-4-甲硫基苯酚 (98.43%), 浙江寿尔福化学有限公司; β -丙氨酸 ($\geq 98\%$), 上海伯奥生物科技有限公司; 94.05% 倍硫磷原药 (BLL), 双鸽集团济宁化工有限公司; N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、N,N-二环己基碳二亚胺 (DCC)、氯甲酸异丁酯、三正丁胺, Acros Organics; 牛血清白蛋白 (BSA)、卵清白蛋白 (OVA), Sigma; Bradford Solution (蛋白质定量测定试剂), 上海申能博彩生物科技有限公司; 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS), Fluka; 弗氏完全/不完全佐剂, Sigma; 羊抗小鼠 IgG-HRP, 武汉博士德生物工程技术有限公司。

1.2 仪器

BP61S 型电子天平, Sartorius; RE-52A 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; 752 型紫外光栅分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; Ultraspec4000 型紫外/可见分光光度仪, Pharmacia Biotech; Multiskan MK3 酶标仪、Wellwash 4MK2 洗板机, Thermo Labsystems; 酶标板, 广州洁特生物过滤制品有限公司; 移液器, 芬兰雷勃。

1.3 试验方法

1.3.1 倍硫磷半抗原的合成

倍硫磷属于不具有免疫原性的小分子农药, 在制备抗体前必须将其与大分子载体偶联制成人工完全抗原, 而偶联前又需要将倍硫磷结构进行衍生, 引入“桥”结构和活性偶联基团, 获得半抗原。

半抗原的合成参考 Kim 等^[7]的方法进行改进, 反应在由甲苯和水组成的两相介质中进行, 使用季铵盐作为两相催化剂。

强烈搅拌下将 5.9 mL 无水甲醇慢慢滴加入 3.0 mL 三氯硫磷中, $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应 30 min, 产物用冷水振荡洗涤 2~3 次, 所得油层为 O-甲基硫代磷酰二氯, 为无色透明液体。

4.8 mL 20% NaOH 溶液逐滴滴入经甲苯稀释的 3.0 g 3-甲基-4-甲硫基苯酚、3.6 g O-甲基硫代磷酰二氯和 0.04 g 季铵盐中, 搅拌反应 1 h, 得粗产物。2.72 g β -丙氨酸溶于 12 mL 20% NaOH, 逐滴加入粗产物中,

搅拌反应 1 h。产物用 2 mol/L HCl 调节 pH 至酸性, 静置分层, 有机相经 2~3 次水洗后减压浓缩, 过硅胶柱纯化, 用试管分步收集, 合并产物管, 经无水 MgSO_4 干燥后过滤, 滤液经减压浓缩得黄色油状产物。产物经硅胶板纯化后, 通过薄层层析、核磁共振氢谱 ($^1\text{H NMR}$) 及质谱鉴定。

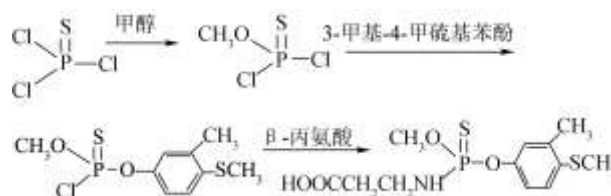


图 2 倍硫磷半抗原合成路线

Fig.2 Synthesis of fenthion hapten

1.3.2 人工抗原的制备^[9]

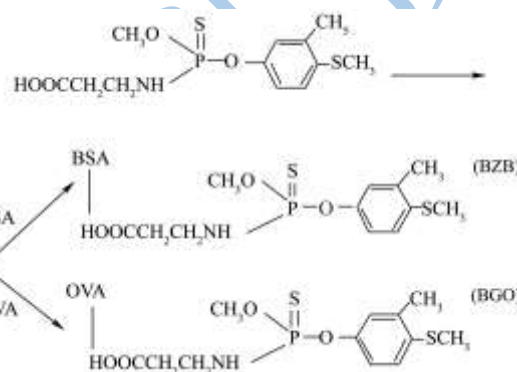


图 3 倍硫磷人工抗原合成路线

Fig.3 Synthesis of BZB and BGO

活化酯法制备免疫原 (BZB): 准确称取半抗原 0.0335 g 和 NHS 0.0115 g, 用 1.0 mL DMF 溶解。磁力搅拌下向上述溶液中逐滴加入 1.0 mL 0.0206 g DCC 的 DMF 溶液中, 室温搅拌反应 1 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 搅拌过夜。在搅拌状态下将上述反应液的上清液逐滴加入 6.0 mL 60 mg BSA 的硼酸盐缓冲溶液 (pH 8.0) 中, 30 min 加完, 室温搅拌反应 1 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应过夜, 次日取出, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生理盐水透析 3 d, 每 4 h 换液一次。转移至塑料离心管中, 1000 r/min 离心 5 min, 取上清液稀释, 分装, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。

混合酸酐法制备包被抗原 (BGO): 准确称取半抗原 0.0335 g 溶于 1.0 mL DMF, 称取 0.0185 g 三正丁胺, 搅拌下逐滴加入上述溶液, 搅拌反应 20 min。再加入氯甲酸异丁酯 0.0137 g, 搅拌反应 1 h。称取 120 mg OVA 溶于 6.0 mL 硼酸盐缓冲溶液 (pH 9.0), 搅拌状态下逐滴加入 1.0 mL DMF, 冰水浴中将上述反应液逐滴加入其中。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应 4 h。同上述法透析。

1.3.3 人工抗原的紫外光谱鉴定

用考马斯亮蓝比色法 (方法参照 Bradford Solution 说明书) 测定人工抗原的蛋白质含量, 然后将 BZB、

BGO、BSA、OVA 和 BLL 各用双蒸水配成 1 mg/mL 溶液,用双蒸水作为对照,200~500 nm 紫外光谱扫描。

1.3.4 人工抗原结合比的测定

用 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS) 比色法^[9,10]测定人工抗原的结合比,计算如下:

BZB 氨基消耗率=(BSA 单位浓度吸光值-BZB 单位浓度吸光值)/BSA 单位浓度吸光值

BGO 氨基消耗率=(OVA 单位浓度吸光值-BGO 单位浓度吸光值)/OVA 单位浓度吸光值

人工抗原与载体蛋白的克分子结合比=人工抗原的氨基消耗率×每分子载体蛋白氨基个数(载体蛋白的游离氨基大部分来自赖氨酸,每分子 BSA 和 OVA 的赖氨酸个数分别以 56 和 20 计)。

1.3.5 免疫动物及抗血清的测定^[9]

用 BZB 免疫 7~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠,首次免疫采用弗氏完全佐剂与 1 mg/mL 的 BZB 溶液等体积混合,乳化均匀后,每只鼠腹腔注射 100 μg。30 d 后改用弗氏不完全佐剂,每隔 14 d 加强免疫 1 次。从第 3 次加强免疫开始,每次免疫后的第 10 d,从小鼠尾部采血,取血清进行间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 分析。

间接竞争 ELISA 分析:在酶标板孔加入倍比稀释的抗血清,每孔 90 μL,然后在每孔加入 100 μg/mL BLL 标样溶液 10 μL,同时设置不加标样的对照和阴性血清对照。37 °C 孵育 1 h,对应转入已封闭好的 2 μg/mL BGO 包被的酶标板内,37 °C 孵育 1 h,洗板机洗板;加入稀释的酶标二抗(1:20000),37 °C 孵育 1 h,洗板机洗板;每孔加入 100 μL 底物工作液(8 g/mL 邻苯二胺溶液 1 mL 加显色液 19 mL 和 30%过氧化氢 20 μL),37 °C 显色 15 min;每孔加入 10%硫酸 50 μL 终止,在酶标仪上读取 492 nm 的吸光值。

2 结果与讨论

2.1 倍硫磷半抗原的鉴定

合成的产物经薄层层析、核磁共振氢谱(¹HNMR)及质谱鉴定,为预期产物 O-甲基-O-((3-甲基-4-甲硫基苯基)-N-羧乙基硫代磷酸酯,鉴定结果如下:

薄层层析:硅胶板,三氯甲烷:乙酸乙酯:冰醋酸=65:35:1, R_f值 0.5; ¹HNMR (CDCl₃, TMS): δ 2.30 (t, 3H, PhCH₃), 2.41 (d, 3H, SCH₃), 2.60 (t, 2H, CH₂CO), 3.34 (m, 2H, NCH₂), 3.78 (m, 3H, CH₃O), 6.98 (s, 1H, Ar), 7.03 (d, 1H, Ar), 7.10 (d, 1H, Ar); APCI-MS (negative) m/z: 333.8[M-H]⁻。

2.2 人工抗原的紫外光谱鉴定

载体蛋白与半抗原通常有不同的紫外吸收,当半

抗原与载体蛋白偶联后,偶合物中就会同时出现载体蛋白和半抗原的吸收峰。当有些半抗原与蛋白质的最大吸收峰发生重叠时,可以根据偶联产物的图谱形状是否发生变化判断偶联是否成功^[11]。

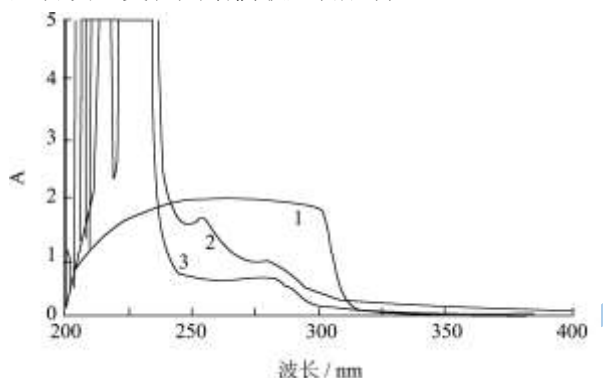


图 4 BZB 的紫外光谱图

Fig.4 UV absorbance spectrum of BZB

注: 1,2,3 依次为 BLL、BZB、BSA。

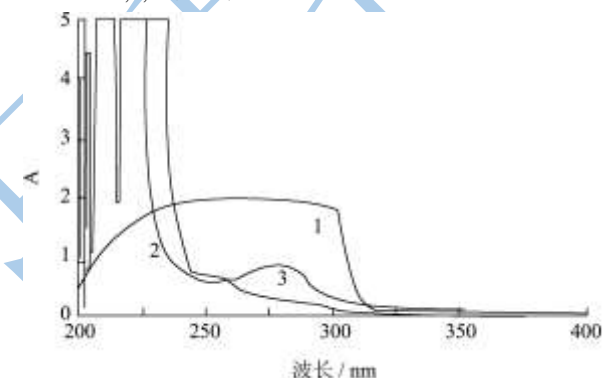


图 5 BGO 的紫外光谱图

Fig.5 UV absorbance spectrum of BGO

注: 1,2,3 依次为 BLL、BGO、OVA。

BZB、BGO 的紫外光谱鉴定结果见图 4、图 5。由图可看出, BZB、BGO 的紫外吸收图谱形状与对应蛋白质相比均发生了明显变化,且在约 260 nm 处出现苯环的紫外吸收峰,初步证明偶合物合成成功。进一步的验证可以通过 TNBS 法和免疫小鼠检测抗血清来实现。

2.3 人工抗原结合比的测定

在人工抗原的鉴定中,用 TNBS 测定偶联前后的游离氨基含量即可推测出其氨基与半抗原上的羧基偶联的程度^[12],方法操作简单,定量较准确。

表 1 TNBS 法测定人工抗原偶联结合比结果

Table 1 Carrier protein ratio of artificial antigen			
人工抗原	单位浓度吸光值	人工抗原氨基消耗率	人工抗原与载体蛋白的偶联结合比
BZB	0.4358	0.5158	29:1
BGO	0.3053	0.5933	12:1

用 TNBS 法测定 BZB、BGO 偶联结合比的结果

如表 1 所示。

连接到蛋白质分子上的半抗原数目并非越多越好^[13]。有研究认为每 100 kDa 载体蛋白上连接 10~30 个半抗原分子较有利于抗体产生^[14]。本实验制备的人工抗原结合比符合该范围要求。

2.4 抗血清的测定

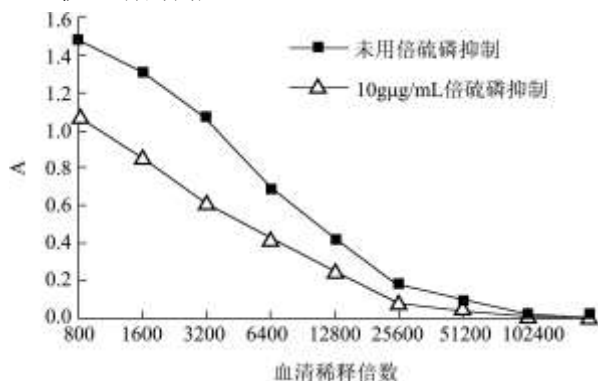


图 6 BZB 免疫 Balb/c 小鼠后的抗血清间接竞争 ELISA 结果

Fig.6 Competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay of antisera

图 6 为 BZB 免疫 Balb/c 小鼠后的抗血清间接竞争 ELISA 分析结果。由图可见,小鼠经免疫后产生了针对倍硫磷的特异性抗体,从而进一步证明倍硫磷半抗原及人工抗原制备成功。

3 结论

3.1 本研究以三氯硫磷为前体,与 3-甲基-4-甲硫基苯酚、 β -丙氨酸反应,引入丙氨酸“桥”结构和活性偶联羧基,合成了倍硫磷半抗原。采用改进的两相反应法进行合成,两步反应连续进行,中间不需经过纯化,可有效地缩短反应时间、简化操作、提高反应效率。

3.2 分别将半抗原以活泼酯法、混合酸酐法与 BSA、OVA 偶联制备了人工抗原 BZB 和 BGO,产物经紫外光谱鉴定。用 TNBS 比色法测定了 BZB、BGO 与载体蛋白的克分子结合比,分别为 29:1 和 12:1。以 BZB 为免疫原免疫 Balb/c 小鼠,获得了针对水胺硫磷的特异性抗血清,从而进一步证明抗原合成成功。本方法简便可行,反应容易实现,为研究建立倍硫磷的免疫分析方法奠定了基础,同时也为其他小分子物质半抗原和人工抗原的设计合成提供了参考。

参考文献

[1] 盛琴琴,汪严华,马志忠,等.农药倍硫磷的毒性[J].中国卫生监督杂志,2001,8(5):219-221

- [2] 孙涛,周晓龙,王建梅.气相色谱法测定牛初乳中甲胺磷、马拉硫磷、倍硫磷的残留[J].现代科学仪器,2006,1:74-75
- [3] 李爱芳,刘晓宇.发光法测定小西红柿中的倍硫磷[J].食品科学,2007,28(6):281-284
- [4] Wang L M, Zhang Q, Chen D F, et al. Development of a Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Analysis of the Organophosphorous Pesticide Fenthion in Real Samples Based on Monoclonal Antibody [J]. Analytical Letters, 2011,44(9): 1591-1601
- [5] Kim M J, Lee H S, Chung D H, et al. Synthesis of haptens of organophosphorus pesticides and development of enzyme-linked immunosorbent assays for parathion-methyl [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 493: 47-62
- [6] Kim Y J, Cho Y A, Lee H S, et al. Investigation of the effect of hapten heterology on immunoassay sensitivity and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the organophosphorus insecticide fenthion [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 494: 29-40
- [7] Kim Y J, Cho Y A, Lee H S, et al. Synthesis of haptens for immunoassay of organophosphorus pesticides and effect of heterology in hapten spacer arm length on immunoassay sensitivity [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 475: 85-96
- [8] Zhang Qi, Wang Laibao, Ahn Ki Chang, et al. Hapten heterology for a specific and sensitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for organophosphorus insecticide fenthion [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 596: 303-311
- [9] 肖治理,孙远明,张木明,等.甲胺磷衍生物的合成及人工抗原的制备[J].食品科学,食品科学,2006,27(12):377-380
- [10] Snyder S L, Sobocinski P Z. An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines[J]. Anal. Biochem., 1975, 64: 284-288
- [11] 陈新建,陈梅英,赵会杰.免疫学技术在植物科学中的应用[M].北京:中国农业大学出版社,1998
- [12] 白坚石,卜凤荣,李松,等.聚乙二醇-人血红蛋白偶联产物的合成与鉴定[J].中国输血杂志,2001,14(3):150-152
- [13] Erlanger B F. Principles and methods for the preparation of drug protein conjugates for immunological studies [J]. Pharmacological Reviews, 1973, 25(2): 271-280
- [14] Hennion M C, Barcelo D. Strength and limitations of immunoassays for effective and efficient use for pesticide analysis in water samples: a review [J]. Analytical Chimica Acta, 1998, 362: 3-34