

异丙威单克隆抗体的制备及鉴定

熊波¹, 梁祖培¹, 刘贵州¹, 刘辉¹, 唐秋实², 袁利鹏³

(1. 广东产品质量监督检验研究院, 广东佛山 528300) (2. 顺德职业技术学院应用化工技术学院, 广东佛山 528300) (3. 广东农工商职业技术学院热作系, 广东广州 510507)

摘要: 异丙威是我国农业生产中常见的杀虫剂, 在果蔬、粮食和烟草等中都有广泛应用, 然而这类农药也具有较强生物毒性。为了制备异丙威单克隆抗体, 以实现对农药异丙威药物的快速检测。本文以 2-异丙基苯酚等为原料, 合成异丙威半抗原及人工抗原, 并通过免疫小鼠、细胞融合、克隆、筛选获得单克隆抗体细胞株, 经腹水诱导法及辛酸-硫酸铵沉淀法制得异丙威单克隆抗体, 通过间接竞争 ELISA 法对抗体的特异性进行鉴定。结果表明, 制备的异丙威单克隆抗体检测范围为 1.88~82.80 ng/mL, 抗体的 IC₅₀ 为 11.70 ng/mL, 最低检测限为 0.54 ng/mL, 抗体与克百威、西维因、涕灭威、灭多威、2-异丙基苯酚 5 种异丙威结构类似物均无明显交叉反应, 具有高特异性, 能够满足农产品中异丙威残留检测的要求。异丙威单克隆抗体的制备为异丙威快速检测产品的开发奠定了基础。

关键词: 异丙威; 单克隆抗体; 酶联免疫吸附法

文章编号: 1673-9078(2017)9-166-170

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.9.024

Preparation and Identification of Monoclonal Antibody against Isoprocarb

XIONG Bo¹, LIANG Zu-pei¹, LIU Gui-zhou¹, LIU Hui¹, TANG Qiu-shi², YUAN Li-peng³

(1. Guangdong Provincial Product Quality Supervision and Inspection Institute, Foshan 528300, China)

(2. Application of Chemical Engineering College, Shunde Polytechnic, Foshan 528300, China) (3. Tropical Crops Department, Guangdong AIB Polytechnic College, Guangzhou 510507, China)

Abstract: Isoprocarb is a common pesticide widely used in fruit, vegetable, and tobacco in China. However, this pesticide also has strong biological toxicity. The aim of this study was to prepare a monoclonal antibody against isoprocarb, to facilitate rapid detection of this pesticide. In this study, 2-isopropylphenol and other compounds were used as raw materials to synthesize the hapten and artificial antigen of isoprocarb. Then, through immunized mice, cell fusion, cloning and screening, the monoclonal antibody cell was obtained, and monoclonal antibodies were obtained by ascites derivation and caprylic acid-ammonium sulfate precipitation. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to identify antibody specificity. The results showed that the monoclonal antibody detection range was from 1.88~82.8 ng/mL, with a half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value of 11.7 ng/mL and an isoprocarb detection limit of 0.54 ng/mL. The antibody had high specificity, and no obvious cross-reactions with the isoprocarb structural analogs carbofuran, carbaryl, aldicarb, methomyl, or 2-isopropyl phenol. This antibody could be used to develop an ELISA assay for rapid isoprocarb detection. The preparation of this monoclonal antibody lays a solid foundation for the development of products to rapidly detect isoprocarb.

Key words: isoprocarb; monoclonal antibody; enzyme-linked immunosorbent assay

异丙威(Isoprocarb, MIPC), 化学名称: 2-异丙基苯基-N-甲基氨基甲酸酯, 属触杀性杀虫剂, 是氨基甲酸酯类杀虫剂中较为常见的一种, 能够通过抑制昆虫体内的乙酰胆碱酯酶的生物活性, 从而将昆虫麻痹致死。近年来, 异丙威已经广泛应用于果蔬、粮食和烟草等作物以防止水稻叶蝉和飞虱类等害虫。然而这类

收稿日期: 2017-03-02

基金项目: 广东省科技计划项目(2013B090600059); 广东省自然科学基金项目(2015A030313793); 国家星火计划面上引导项目(S2015E000181)

作者简介: 熊波(1989-), 男, 工程师, 研究方向: 食品质量与安全

农药也具有较强生物毒性^[1], 因此有必要对农产品中异丙威残留进行检测分析。为了提升对农产品中异丙威药物的检测水平, 研究人员通过现代仪器检测设备开发了异丙威的高效液相色谱检测法(HPLC)^[2,3]、气相色谱检测法(GC)^[4,5]、高效液相色谱-质谱联用检测法(HPLC-MS)^[6]和气相色谱-质谱联用检测法(GC-MS)^[7,8]等仪器检测法, 然而这些检测方法都存在仪器设备昂贵、前处理复杂和检验周期长等缺陷, 无法满足现行对农产品中农药残留快速、准确的检测需求。免疫检测法具有灵敏度高、特异性强、前处理简单和检验周

期短等优点, 研究人员已利用该方法开发了多种农药的快速检测试剂盒, 并已得到了市场的认可, 然而关于异丙威的免疫检测方法的研究却未见报道。

免疫检测法的前提是制备获得特异性抗体。因此, 本文通过合成异丙威半抗原、人工抗原, 进而制备异丙威单克隆抗体, 旨在开发一种异丙威免疫检测方法, 以便为进一步的异丙威快速检测试剂盒的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清白蛋白(OVA)购自上海生科公司; 对醛基苯甲酸、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)、N-羟基琥珀酸亚胺(NHS)、2-异丙基苯酚、对硝基苯氯甲酸酯、4-氨基丁酸、异丙威标准品均购自阿拉丁试剂公司; 羊抗鼠 IgG-HRP、弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自美国 Sigma 公司。

1.1.2 实验动物

Balb/c 小鼠, 雌性, 7~8 周龄, 体重 20~22 g, 购自广东省实验动物中心。

1.1.3 主要仪器与设备

旋转蒸发仪(上海爱朗仪器); 磁力搅拌器(巩义市予华仪器厂); 液相色谱串联质谱联用仪(安捷伦公司); 紫外/可见分光光度计(岛津公司); 酶联免疫检测仪(Thermo scientific 公司); 离心机(Thermo scientific 公司)。

1.2 方法

1.2.1 半抗原的合成

称取 1.36 g 2-异丙基苯酚溶于 20 mL 二氯甲烷后, 加入 0.5 mL 吡啶形成混合溶液, 然后向混合溶液中滴加 2.0 g 对硝基苯氯甲酸酯, 整个体系保持在 4 °C 以下冰盐浴。用薄板层析(TLC)跟踪反应, 确定 3 h 结束反应。反应液先用 3% 的盐酸于分液漏斗中振荡洗涤, 过柱纯化, 得到淡黄色的晶体。

取 0.67 g 上述制得的产物溶于 12 mL 四氢呋喃中, 0.3 g (2.4 mmol) 4-氨基丁酸溶于 5 mL 饱和碳酸氢钠溶液中, 然后把四氢呋喃溶液逐滴加入碳酸氢钠溶液中, 滴加过程保持冰浴, 用 TLC 跟踪反应, 室温反应 4.5 h。反应结束后, 在冰浴下加 4 mol/L 的 HCl 将反应液的 pH 值调为微酸性, 用乙酸乙酯萃取 3 次, 有机相加无水 Na₂SO₄ 干燥, 过柱纯化, 收集目标组

分, 减压蒸馏除去溶剂得到白色固体。具体合成路线见图 1。

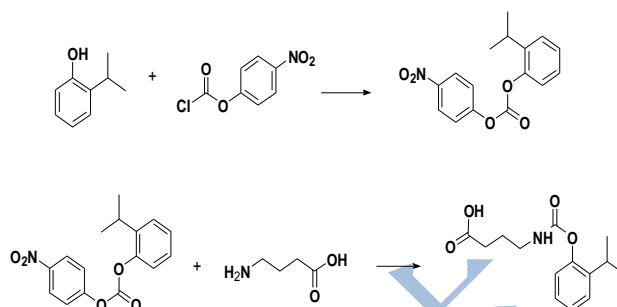


图 1 异丙威半抗原的合成路线

Fig. 1 Synthetic route for MIPC hapten

1.2.2 人工抗原的合成

采用活泼酯法^[9]制备了免疫原(MIPC-H-BSA), 同时利用混合酸酐法^[10]制备了包被抗原(MIPC-H-OVA)。具体操作步骤如下: 将 100 μmol 半抗原(MIPC-H)溶解于 0.5 mL DMF 中, 然后在该溶液中加入等摩尔的 DCC 和 NHS(制备包被抗原时为正三丁胺和氯甲酸乙酯), 让其在室温下搅拌过夜反应后离心, 取上清液缓慢加入到 5 mL、15 mg/mL 的 BSA 或 OVA 碳酸盐缓冲溶液(pH 为 9.6)中, 然后搅拌反应 8 h, 待反应完成后, 装入透析袋用 PBS 透析 3 d, 每天换水 3 次, 最后分装保存于 -20 °C 的冰箱中。

1.2.3 免疫方案

将制备的免疫抗原与弗氏完全佐剂等量混合, 完全乳化后, 腹部皮下注射 7~8 周龄 Balb/c 雌性小鼠, 剂量为含 MIPC-H-BSA 100 μg, 以后每隔 3 周以同剂量取人工抗原与弗氏不完全佐剂混合乳化后皮下多点注射, 共加强免疫 4 次, 融合前 3 d 加倍剂量强化免疫一次。

1.2.4 细胞融合和单克隆抗体制备

将小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞与脾细胞以 5:1 的比例混合, 在 50% PEG 下融合, 洗涤、离心后以 HAT 培养基悬浮, 接种于含饲养细胞的 96 孔培养板中, 在 37 °C、5% 的 CO₂ 培养箱中培养 3 d 后以 HAT 培养基换液, 第 10 d 换成 HT 培养基。待板内细胞长至培养孔面积的 1/3 时, 间接 ELISA 法筛选细胞阳性孔, 筛选时以 MIPC-H-OVA 作为包被抗原。阳性孔进一步用间接 ELISA 鉴定筛选, 有限稀释法克隆至大约每孔 1 个细胞, 10 d 后检测为阳性且竞争较好的单克隆孔所得细胞株即为分泌单克隆抗体的细胞株。杂交瘤细胞扩大培养后, 用于腹水制备。

1.2.5 腹水的制备和纯化

Balb/c 小鼠腹腔注射降植烷, 3 mL/只, 7~10 d 后于每只小鼠腹腔注射阳性克隆的杂交瘤细胞

(1~2)×10⁸ 个/mL。待小鼠腹部长大后抽取腹水，离心取上清，采用饱和硫酸铵沉淀法^[11]除去杂蛋白，再过 protein A 柱子纯化出 IgG。

1.2.6 竞争 ELISA 方法的建立

用棋盘滴定确定最佳包被浓度和抗体稀释倍数，采用常规 ELISA 操作步骤，建立稳定灵敏的 ELISA 间接竞争方法。四参数拟合曲线，计算 IC₅₀，定量检测范围，确定检测限。

1.2.7 添加回收实验

分别选择白菜、韭菜、辣椒和空心菜 4 种为空白样品，将蔬菜打浆，用异丙威标准品母液配置成 5 ng/g 和 10 ng/g 的加标浓度，加入 10 mL、50%的甲醇/水溶液(1:1, V/V)，震荡 5 min，4000 r/min 离心 5 min，每个水平做 3 次平行实验。检测时吸取上清液进行试验，用间接竞争 ELISA 测定各个添加浓度的抑制率，通过工作曲线求出样品中的农药含量，计算各个药物在 4 种样品中的回收率及其变异系数。

2 结果与分析

2.1 半抗原的结构鉴定

利用质谱法对制备的半抗原进行测定，结果如图 2 所示。

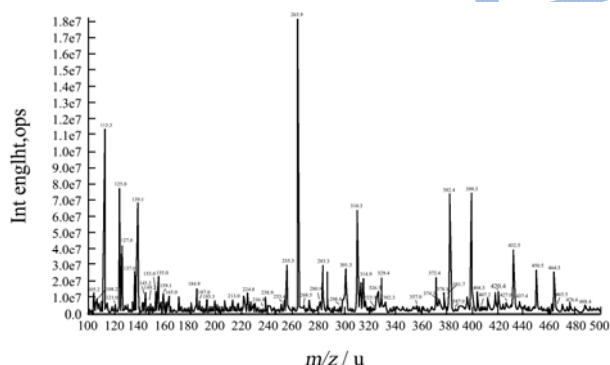


图 2 半抗原负离子质谱图

Fig. 2 MS of MIPC-H in negative ionization mode

从图 2 可知，反应产物物中存在 *m/z* 为 263.9 的质谱峰，该产物相对分子质量与目标产物的相对分子质量 265.13 一致，结合反应路线，可以确定合成产物即为所需的目标半抗原。同时可见，263.9 的分子离子峰为最强峰，表明新产物为反应体系中的主要物质，说明合成的半抗原具备相对较高的纯度。

2.2 人工抗原的鉴定

半抗原没有免疫原性，直接注射入动物体内不能诱导抗体的产生，所以必须与大分子载体偶联形成免疫原后，再免疫动物才能制备出相应的抗体，所以人

工抗原偶联是否成功直接关系到抗体的质量和整个实验成败。载体蛋白和半抗原一般在紫外-可见光区有各自的吸收峰，如果偶联成功，则偶联物会同时具有载体蛋白和半抗原的特征吸收峰^[12]。

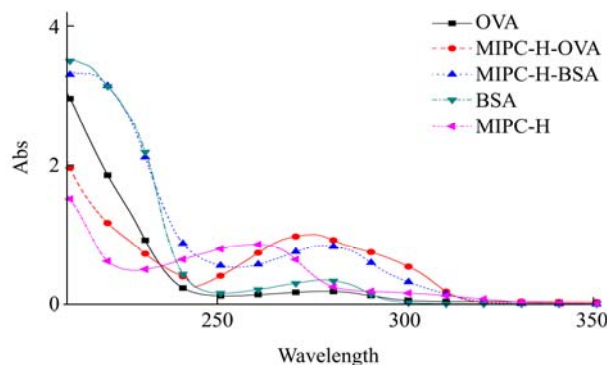


图 3 MIPC-H-BSA/OVA 紫外吸收曲线

Fig. 3 UV spectra of MIPC-H-BSA/OVA

由图 3 可以看出，相比半抗原(最大吸收 262 nm)和载体蛋白(最大吸收 280 nm)，合成的免疫原和包被抗原的特征吸收已经发生明显蓝移。这是因为在载体蛋白上成功偶联半抗原后，半抗原最大吸收和载体蛋白最大吸收相互叠加，导致合成的免疫原和包被原最大吸收发生蓝移。因此，通过紫外光谱扫描结果可以判定人工抗原合成成功。

2.3 抗体灵敏度的测定

对制备的抗体进行间接 ELISA 实验^[13]，采用 Originlab 7.5 的四参数拟合模块对间接竞争 ELISA 反应曲线进行 S 拟合，以 MIPC-H-OVA 为包被原，建立了异丙威的间接 ELISA 标准曲线如图 4 所示，计算得抗体 IC₅₀ 为 11.70 ng/mL，定量检测线性范围为 1.88~82.80 ng/mL，最低检测限为 0.54 ng/mL。

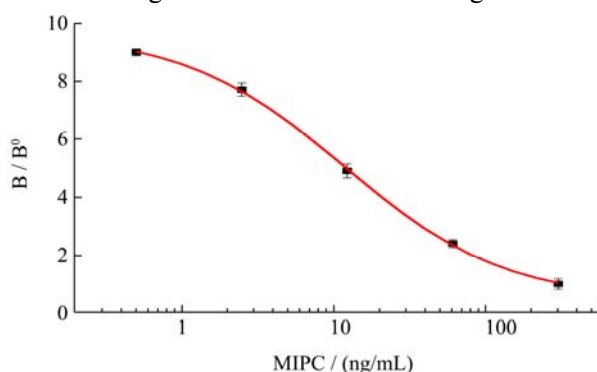


图 4 异丙威的间接 ELISA 标准曲线

Fig. 4 icELISA standard curve of MIPC

2.4 单克隆抗体的特异性

抗体特异性是以交叉反应率(Cross-reactivity, CR)来表示的。交叉反应率可通过测定抗体对药物的

灵敏度（用半抑制浓度表示， IC_{50} ）来确定的，以一个检测对象作为对照（CR 设为 100%）。本文以抗体对异丙威的 IC_{50} 值作为对照，抗体对其他药物的交叉反应计算如公式所示：

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{IC_{50(\text{异丙威})}}{IC_{50(\text{竞争物})}} \times 100\%$$

表 1 单克隆抗体与异丙威类似化合物的交叉反应

Table 1 Cross-reactivity of polyclonal antibody with the analogous compounds of isoprocarb

化合物	分子结构	$IC_{50}/(\mu\text{g/L})$	CR/%
异丙威		11.70	100
克百威		$>5.0 \times 10^4$	$<1.0 \times 10^{-2}$
西维因		$>5.0 \times 10^4$	$<1.0 \times 10^{-2}$
涕灭威		$>5.0 \times 10^4$	$<1.0 \times 10^{-2}$
灭多威		$>5.0 \times 10^4$	$<1.0 \times 10^{-2}$
2-异丙基苯酚		$>5.0 \times 10^4$	$<1.0 \times 10^{-2}$

用间接竞争 ELISA 检测异丙威结构类似物克百威、西维因、涕灭威、灭多威和 2-异丙基苯酚的 50% 抑制浓度，见表 1。从表 1 可以看出，克百威、西维因、涕灭威、灭多威和 2-异丙基苯酚作为竞争抑制抗原的 IC_{50} 均大于 5.0×10^4 ，交叉反应率均小于 1.0×10^{-2} 。由上述结果可知，采用本方法制备的异丙威单克隆抗体与异丙威结构类似物均无交叉反应，说明半抗原的结构设计合理，制备的抗体特异性良好。

2.5 添加回收实验

采用上述 ELISA 方法，对白菜、韭菜、辣椒和空心菜 4 种蔬菜样品进行检测，每个添加浓度水平作 3 次平行，结果显示，蔬菜样品的平均回收率为 83.0%~90.20%，变异系数均小于 20%，表明间接竞争 ELISA 具有较高的准确度，能够满足异丙威残留的检测要求。

表 2 添加回收实验

Table 2 Recovery test results (n = 3)

添加药物	添加量/(ng/g)	平均回收量 \pm SD/ng	平均回收率/%	CV/%
白菜	10.0	8.42 \pm 1.45	84.20	17.22
	5.0	4.35 \pm 0.77	87.00	17.70
韭菜	10.0	8.69 \pm 1.41	86.90	16.22
	5.0	4.25 \pm 0.65	83.00	15.29
辣椒	10.0	8.63 \pm 1.25	86.30	14.48
	5.0	4.51 \pm 0.58	90.20	12.86
空心菜	10.0	8.82 \pm 1.45	88.20	16.44
	5.0	4.46 \pm 0.75	89.00	16.81

3 结论

本研究成功合成了异丙威半抗原和抗原,通过免疫和细胞融合技术,获得了异丙威单克隆抗体,并建立了异丙威单克隆抗体的间接竞争 ELISA 检测方法,抗体的 IC_{50} 为 11.70 ng/mL,定量检测线性范围为 1.88~82.80 ng/mL,最低检测限为 0.54 ng/mL。抗体与克百威、西维因、涕灭威、灭多威、2-异丙基苯酚 5 种异丙威结构类似物均无明显交叉反应,具有较高特异性。制备的抗体完全能够满足检测的要求,可应用于异丙威快速检测产品的开发。

参考文献

- [1] 许莲瑛,刘蔼成,伏景唐,等.异丙威的毒性研究[J].实用预防医学,2002,9(6):675-678
XU Lian-ying, LIU Ai-cheng, FU Jing-tang, et al. Study of isoprocarb (MIPC) toxicity [J]. Practical Preventive Medicine, 2002, 9(6): 675-678
- [2] 金海涛,张晓波,任红波,等.高效液相色谱法测定稻米中异丙威的残留方法研究[J].农药科学管理,2010,31(7):35-37
JIN Hai-tao, ZHANG Xiao-bo, REN Hong-bo, et al. Determination of isoprocarb residues in rice with HPLC [J]. Pesticide Science and Administration, 2010, 31(7): 35-37
- [3] Xiaoxing Ma, Juntao Wang, Qihua Wu, et al. Extraction of carbamate pesticides in fruit samples by graphene reinforced hollow fibre liquid microextraction followed by high performance liquid chromatographic detection [J]. Food Chemistry, 2014, 157(11): 119-124
- [4] 潘守奇,孙军,董静,等.气相色谱法测定水果和蔬菜中异丙威、啉霉胺、抑霉唑残留量[J].食品科学,2008,29(12): 516-518
PAN Shou-qi, SUN Jun, DONG Jing, et al. Simultaneous determination of pyrimethanil, isoprocarb and imazalil multiresidues in fruits and vegetables with gas chromatography [J]. Food Science, 2008, 29(12): 516-518
- [5] 陈妍,蒋丹,金林红,等.气相色谱法同时测定水稻上的异丙威和毒死蜱[J].农药,2013,52(3):213-216
CHEN Yan, JIANG Dan, JIN Lin-hong, et al. Simultaneous determination of isoprocarb and chlorpyrifos in rice by GC [J]. Agrochemicals, 2013, 52(3): 213-216
- [6] 付明磊,陈旭,周先丽,等.HPLC-MS 法测定罗汉果中 10 种氨基甲酸酯类农药 [J]. 食品研究与开发,2016, 37(16):133-136
FU Ming-lei, CHEN Xu, ZHOU Xian-li, et al. Determination of 10 kinds of carbamate pesticides in *Siraitia grosvenorii* by HPLC-MS [J]. Food Research and Development, 2016, 37(16): 133-136
- [7] 邓维先.气质联用仪快速测定水稻中的异丙威残留[J].贵州农业科学,2014,42(1):113-117
DENG Wei-xian. Simplified method determination of isoprocarb residues in rice using GC-MS [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2014, 42(1): 113-117
- [8] 高美佳,李晔,蔡亦军,等.气相色谱-质谱法测定葱中的 41 种农药残留[J].中国卫生检验杂志,2016,26(5):631-635
GAO Mei-jia, LI Ye, CAI Yi-jun, et al. Determination of 41 pesticide residues in shallot by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2016, 26(5): 631-635
- [9] K. V. Singh, Jasdeep Kaur, Grish C Varshney, et al. Synthesis and characterization of hapten-protein conjugates for antibody production against small molecules [J]. Bioconjugate Chemistry, 2004, 15(1): 168-173
- [10] 朱国念,吴银良,程敬丽.克百威人工抗原的合成与鉴定[J].浙江大学学报,2002,28(1):47-53
ZHU Guo-nian, WU Yin-liang, CHEN Jing-li. Synthesis and identification of the antigens for carbofuran [J]. Journal of Zhejiang University, 2002, 28(1): 47-53
- [11] 陈伯群,吴美英,叶群瑞.几种部分纯化单克隆抗体方法的比较[J].病毒学报,1990,6(2):122-126
CHEN Bo-qun, WU Mei-ying, YE Qun-rui. Comparative studies of different purification method's for monoclonal antibody (McAb) [J]. Chinese Journal of Virology, 1990, 6(2): 122-126
- [12] 邓浩,孔德彬,杨金易,等.对硫磷化学发光酶联免疫吸附分析方法的建立和评价[J].分析化学,2013,41(2):247-252
DENG Hao, KONG De-Bin, YANG Jin-yi, et al. Development of an indirect competitive chemiluminescence enzyme-linked immunoassay for parathion [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 41(2): 247-252
- [13] 陈荫楠,陈华,石贤爱,等.抗呋喃唑酮单克隆抗体的制备及其应用[J].食品科学,2016,37(3):157-163
CHEN Yin-nan, CHEN Hua, SHI Xian-ai, et al. Preparation and application of monoclonal antibody against furazolidone [J]. Food Science, 2016, 37(3): 157-163