

氟乐灵抗体的制备及其酶联免疫分析方法的建立

黄惠威¹, 刘凤银¹, 曾思敏¹, 曾羲², 钱振杰², 施迪燊¹, 聂玉丹¹, 江海超¹, 袁学文¹, 穆洪涛^{1*}

(1. 广东第二师范学院生物与食品工程学院, 广东广州 510303) (2. 广州市食品检验所, 广东广州 511400)

摘要: 该研究针对农(水)产品中氟乐灵农药残留的问题, 建立了间接竞争酶联免疫分析方法, 快速检测氟乐灵农药。利用 3,5-二硝基-4-氯-三氟甲苯与仲胺侧链氨基反应合成半抗原 2C, 采用碳二亚胺法将半抗原 2C 与牛血清白蛋白/卵清蛋白偶联成完全抗原。通过免疫新西兰大白兔获得多克隆抗体 PcAb-2C, 基于间接竞争酶联免疫分析方法原理对包被原和抗体的稀释倍数、包被温度、抗体和标准品稀释液等 7 个因素进行系统优化, 最终建立间接竞争酶联免疫分析方法。结果表明: 该方法的 IC₅₀ 为 54.07 ng/mL, 最低检测限为 7.22 ng/mL, 线性范围为 12.56~282.62 ng/mL, 与 20 种氟乐灵结构类似物进行交叉反应, 只有 2 种药物的交叉反应率大于 15%, 方法特异性良好; 对大豆、大豆油和鳗鱼等样品进行检测, 添加回收率为 89.8%~106.4%, 变异系数小于 10%。采用气相色谱法进行验证, 添加回收率为 89%~108.2%, 变异系数小于 10%, 两种方法测定结果呈现良好的线性关系 (R²=0.99)。该研究所建立的方法具有灵敏度高、特异性强、准确度高优点, 适用于农(水)产品中氟乐灵农药残留的高通量快速检测。

关键词: 氟乐灵; 间接竞争酶联免疫分析方法; 快速检测; 农产品; 水产品

文章编号: 1673-9078(2022)01-345-354

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.0470

Preparation of Trifluralin Antibody and Development of Enzyme Linked Immunosorbent Assay

HUANG Huiwei¹, LIU Fengyin¹, ZENG Simin¹, ZENG Xi², QIAN Zhenjie², SHI Dishen¹, NIE Yudan¹,
JIANG Haichao¹, YUAN Xuewen¹, MU Hongtao^{1*}

(1. College of Biology and Food Engineering, Guangdong University of Education, Guangzhou 510303, China)

(2. Guangzhou Institute for Food Inspection, Guangzhou 511400, China)

Abstract: An indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay (ic-ELISA) was developed to rapidly detect trifluralin pesticide in agricultural or aquatic products in this paper. Hapten 2C was synthesized by the reaction of 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride and secondary amine side chain amino group. And then hapten 2C was coupled with BSA or OVA to synthesize complete antigens by carbodiimide method. After that, polyclonal antibody PcAb-2C was obtained by immunizing New Zealand rabbits. Based on the principle of indirect enzyme linked immunosorbent assay, seven factors including dilution ratio of coating antigen and antibody, coating temperature, antibody and standard diluent were systematically optimized, and finally the indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay was developed. Under the optimized conditions, the IC₅₀ of this developed ic-ELISA was 54.07 ng/mL, the detection limit was 7.22 ng/mL, and the linear range was 12.56~282.62 ng/mL. The cross reaction with 20 trifluralin analogues showed good specificity (The cross reaction rate of two drugs was more than 15%). The recoveries of soybeans, soybean oil and eels were 89.8%~106.4%, and the coefficients of variation were less than 10%. The developed method was verified by gas chromatography and the recoveries were 89%~108.2% with the coefficients of variation less than 10%. The results showed a good linear relationship (R²=0.99). The above data show that the established method in this study has the advantages of high sensitivity, high

引文格式:

黄惠威,刘凤银,曾思敏,等.氟乐灵抗体的制备及其酶联免疫分析方法的建立[J].现代食品科技,2022,38(1):345-354

HUANG Huiwei, LIU Fengyin, ZENG Simin, et al. Preparation of trifluralin antibody and development of enzyme linked immunosorbent assay [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 345-354

收稿日期: 2021-04-28

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31601540); 广东省自然科学基金博士启动项目 (2016A030310304); 广东大学生科技创新培育专项资金资助项目 (PDJH2020A0424)

作者简介: 黄惠威 (1998-), 女, 本科生, 研究方向: 食品安全快速检测, E-mail: HHW2505@163.com

通讯作者: 穆洪涛 (1981-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品安全快速检测, E-mail: muhongtao@gdei.edu.cn

specificity and high accuracy, which is suitable for the high-throughput rapid detection of trifluralin pesticide residues in agricultural (aquatic) products.

Key words: trifluralin; indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay; rapid detection; agricultural products; aquatic products

氟乐灵属于二硝基苯胺类药物^[1], 广泛应用于防除单子叶杂草^[2], 也可以抗有丝分裂阻止染色体加倍获得单倍体植株^[3,4], 具有价格低廉、药效明显等特点^[5,6]。然而氟乐灵会残留在食品或环境中, 对水生生物和环境造成危害, 也会极大影响人体健康^[7-9], 例如胎儿发育不正常、内分泌功能失调和致癌等^[10,11]。

氟乐灵的广泛应用造成大量氟乐灵农药残留量超标现象^[12,13], 因此许多国家和组织对氟乐灵农药制定了严格的残留限量^[14-16]。例如, 欧盟规定玉米、棉籽和花生仁中氟乐灵农药残留量为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[6], 日本规定油为 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 澳大利亚规定油料为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[7], 中国规定大豆、花生、豆油、花生油、玉米、棉籽、花生仁为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[7,16]。氟乐灵农药在土壤中留存持久, 半衰期约为 3~12 个月^[17], 氟乐灵的广泛应用和长期存在, 对水生生物具有高毒^[18], 也会影响农作物的出苗率和生长^[19]。2010 年日本屡次检出中国出口的水产品梭子蟹和鳗鱼中的氟乐灵超标^[20], 因此日本要求加强对中国梭子蟹和鳗鱼中的氟乐灵农药的监控检查, 造成中国水产品梭子蟹和鳗鱼的出口难度加大。2019 年《食品安全国家标准食品中农药最大残留限量》(GB 2763-2019) 规定食用油中氟乐灵为必检农药残留项目, 规定最大残留限量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[21], 因此建立农(水)产品中高通量快速检测氟乐灵残留的方法很有必要。

目前, 对于大豆、花生、豆油、花生油中的氟乐灵残留量的检测, 我国规定气相色谱法作为标准检测方法^[16]。近几年国内外主要采用色谱法^[22,23]、电化学方法^[24-26]、荧光法^[27,28]检测氟乐灵残留, 虽然这些方法可靠准确, 但耗时较长且专业人员要求较高, 检测成本较高, 不适用高通量现场快速筛查, 而酶联免疫分析方法具有高通量、灵敏度较高、特异性较好、耗时较短、成本较低、操作简单且适合基层推广应用等优点, 是当前快速检测的主要方法^[29-31], 但现阶段国内缺乏快速检测氟乐灵农药的酶联免疫分析方法。2000 年 Hegedüs 等^[32]制备了氟乐灵多克隆抗体, 采用酶联免疫分析方法对地表水样和蔬菜汁进行氟乐灵残留检测; 2008 年 Krämer 等^[33]采用酶联免疫分析方法对水和土壤中的氟乐灵残留进行了检测。以上研究主要针对水样、土壤、蔬菜汁等进行氟乐灵残留检测, 而本研究开发了针对大豆、大豆油、对虾等农(水)产品中的氟乐灵残留快速检测方法, 为满足现阶段国

内对氟乐灵检测的需求和提高食品安全水平具有重要意义。

本研究设计并合成了一种新型的氟乐灵完全抗原, 通过免疫新西兰大白兔获得多克隆抗体, 并对包被原和抗体的稀释倍数、包被温度、抗体和标准品稀释液等条件进行系统优化, 进而建立一种检测农(水)产品中氟乐灵农药残留的间接竞争酶联免疫分析方法(indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay, ic-ELISA), 该方法具有灵敏度高、特异性好的特点, 为进一步开发氟乐灵残留酶联免疫检测试剂盒或试纸条提供理论依据, 也为农(水)产品安全提供更有效的保障, 从而保障人类的身体健康。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新西兰大白兔 广东省医学实验动物中心; 氟乐灵、牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、二环己基碳化二亚胺(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(FCA)、弗氏不完全佐剂(FICA)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF) 广州齐云生物技术有限公司; 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 沈阳万类生物科技有限公司; 聚苯乙烯酶标板厦门怡佳美实验器材有限公司; 氟乐灵 20 种结构类似物荷兰 specs 生物特殊化合物服务有限公司; 包被液、磷酸盐缓冲液(PBS)、含吐温-20 的磷酸盐缓冲液(PBST)、Tris-HCl 缓冲液(Tris-HCl) 实验室配制; 其它化学试剂均为国产分析纯。洗涤液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 16 g, NaCl 40 g, 吐温-20 3 mL, 用蒸馏水定容到 500 mL; 封闭液: 硼酸 3.22 g, 四硼酸钠 3.26 g, 蔗糖 30 g, 酪蛋白 2 g, 鱼皮明胶 4 g, 氨基比林 1 g, Proclin 300 0.5 mL; 终止液: 10%硫酸溶液; TMB 显色液: 过氧化脲 0.03 g, α 液 45 mL, TMB 0.03 g, DMSO 1.8 mL, β 液 36 mL, 甘油 4 mL。

DK-8AD 电热恒温水热槽, 上海一恒科学仪器有限公司; XP.5002 电子天平, 上海越平科学仪器有限公司; RE-52A 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; MX-F 震荡仪、PHSI-5 实验室 PH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; RT-3100 全自动洗板机, 深圳雷杜生命科学股份有限公司; SP-Max2300 光吸收型全波长酶标仪, 上海闪谱生物科技有限公司; Agilent

7890B 气相色谱 (配 ECD)、色谱柱 (DB-1701, 30 m×0.25 mm×0.25 μm), 美国安捷伦科技有限公司; 料理机 (L22-Y86), 九阳股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 氟乐灵半抗原的合成与鉴定

氟乐灵半抗原 2C 合成路线如图 1 所示。将 2-吡咯烷酮 (1000 mg, 11 mmol) 溶于 10 mL DMF, 加入 13.2 mmol 氢化钠 (60%) 和正溴丙烷 (1758.9 mg, 14.3 mmol), 在氮气保护下, 70 °C 油浴搅拌过夜。反应液中加入 70 mL 乙酸乙酯和 50 mL 饱和氯化铵溶液, 进行萃取后合并有机相, 用 10 g 无水硫酸钠干燥 20 min。40 °C 旋干 (0.09 MPa), 获得含酯基的仲胺中间体。将其加入 13 mL 4 mol/L NaOH 溶液于 100 °C 油浴搅拌过夜进行水解得到水解产物后, 将 3,5-二硝基-4-氯-三氟甲苯溶解于 6 mL 四氢呋喃, 加入到水解产物中, 室温搅拌 1 h。然后用 30 mL 水进行稀释, 加 1 mol/L 盐酸调 pH 至 2~3, 沉淀物出现。再用乙酸乙酯萃取两次, 沉淀溶解。之后用 10 mL 饱和食盐水对有机相分别进行洗涤, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 40 °C 旋干, 用层析液于硅胶板进行分离, 获得产物半抗原 2C。半抗原 2C 分离纯化后, 经薄层层析初步鉴定, 再通过高分辨质谱 (MS) 和核磁共振氢谱 (NMR) 等手段进行精细结构鉴定。

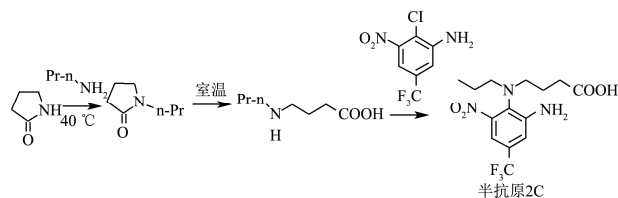


图 1 氟乐灵半抗原 2C 合成路线

Fig.1 The synthesis route of trifluralin hapten 2C

1.2.2 人工完全抗原的制备和鉴定

本研究采用碳二亚胺法偶联合成人工完全抗原, 在偶联过程中碳二亚胺能使半抗原的羧基与蛋白质的氨基发生缩合, 生成酰胺和酯。免疫原采用了 BSA 为载体蛋白, 包被原则采用了 OVA 作为载体蛋白, 抗原经过透析纯化后采用紫外吸收光谱进行鉴定。

1.2.2.1 活化半抗原 2C

称取 22 mg 半抗原 2C 置于 10 mL 棕色玻璃瓶内, 加入 1 mL 无水 DMF 和磁子, 置于磁力搅拌器上搅拌 5 min, 溶解完全为 α 液; 称取 24.05 mg DCC 于 1 mL 离心管内, 加入 96 μL 无水 DMF, 振动使其完全溶解为 β 液; 称取 13 mg NHS 于 1 mL 离心管内, 加入 25 μL 无水 DMF, 振动使其完全溶解为 γ 液。取 α 液加入 β 、 γ 液置于 4 °C 下磁力搅拌过夜, 后将其转移至

1.5 mL 离心管, 19000 r/min 离心 10 min, 取上清液于新离心管中, 为 δ 液。

1.2.2.2 2C-BSA/OVA 的偶联

称取 20 mg BSA/OVA 置于 10 mL 棕色玻璃瓶中, 加入 4 mL PBS 缓冲液和磁子于磁力搅拌器上持续搅拌后, 向 BSA/OVA 溶解液中缓慢滴入 582.4 μL/512.2 μL 的 δ 液, 4 °C 磁力搅拌 12 h, 8000 r/min 离心 20 min, 取上清液。将上清液透析 3 d, 每日透析 3 次, 透析结束后保留最后一次透析液进行浓度调整; 波长设置为 200~800 nm, 对 2C、2C-BSA、2C-OVA、BSA、OVA 进行紫外吸收光谱鉴定; 鉴定完成后分装标记好后存于 -20 °C, 以备后续试验。

1.2.3 动物免疫与多克隆抗体的制备

将 2C-BSA 与等量的弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂等量乳化, 初次免疫使用弗氏完全佐剂, 加强免疫则使用弗氏不完全佐剂, 采用乳化器进行乳化直至溶液变成白色乳浊液且滴到水面上 30 s 内不扩散后进行免疫。选取两只洁净、体重为 1.5~2.0 kg 新西兰大白兔进行背部皮下 4~5 点注射, 每两周加强注射一次。首次免疫剂量为 2 mL/只, 后面每次免疫 1 mL/只, 每次免疫间隔时间为 2 周。共进行 5 次加强免疫, 最后一次加强免疫后第 7 d 从兔子心脏取全血, 孵育 30 min, 10000 r/min 离心 10 min, 收集上清液并分装储存于 -20 °C。

1.2.4 ic-ELISA 基本步骤

包被: 用 PBS 稀释液液稀释包被抗原, 37 °C 包被 13 h; 封闭: 洗涤液洗板 2 次, 加入 120 μL 封闭液, 37 °C 封闭 3 h; 烘干: 甩干孔中液体, 37 °C 烘干 1 h; 加样: 加入氟乐灵标准品和兔抗溶液 50 μL/孔, 37 °C 孵育一段时间; 加酶标二抗溶液: 洗板 5 次, 加入稀释到最佳倍数的酶标二抗溶液 100 μL/孔, 孵育一定时间; 显色: 洗板 5 次, 加入 TMB 显色液 100 μL/孔, 37 °C 水浴锅反应 10 min; 终止反应: 加入终止液 50 μL/孔, 用酶标仪在 450 nm 下测定 OD 值。

1.2.5 ic-ELISA 方法的优化

采用棋盘滴定法确定包被抗原及抗体的最适工作浓度, 用包被原稀释液将 1 μg/mL 包被原分别按 1:2000、1:4000、1:6000、1:8000、1:10000、1:12000、1:14000、1:16000 稀释, 用 PBST 溶液将 2.26 μg/mL 抗体按 1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000 稀释, 按照 ic-ELISA 基本步骤操作, 确定最佳包被稀释倍数及抗体稀释倍数。

将包被原和抗体稀释至最佳工作浓度后, 选取 37 °C 和 4 °C 两种温度包被 13 h, 按照 1.2.4 ic-ELISA 基本步骤操作, 选择 Amax 在 0.8~1.5 之间, Amax/IC₅₀

(IC_{50} 为半数抑制浓度)最大, IC_{50} 最小时的条件为 ic-ELISA 的最佳工作条件; 最适包被温度确定后, 选择 Tris-HCl、PBS 和 PBST 稀释液稀释抗体和标准品, 按照 ic-ELISA 基本步骤操作, 得到抗体稀释液与标准品稀释液不同组合条件下的标准曲线, 综合考虑 A_{max} 值、 IC_{50} 值和 A_{max}/IC_{50} 值, 确定最佳抗体稀释液与标准品稀释液的组合; 确定好以上最佳工作条件后, 设置 20、30、40、50 和 60 min 五个竞争反应时间梯度, 按照 ic-ELISA 基本步骤操作, 选择 A_{max} 在 0.8~1.5 之间, 灵敏度高的反应时间作为最佳条件; 基于以上优化好的工作条件, 最后对酶标二抗稀释液进行优化, 选择选择 Tris-HCl、PBS 和 PBST 三种稀释液稀释酶标二抗, 按照 ic-ELISA 基本步骤操作, 综合考虑 A_{max} 值、 IC_{50} 值和 A_{max}/IC_{50} 值, 确定最优的酶标二抗稀释液。

1.2.6 标准曲线的绘制

在上述优化条件下, 梯度稀释标准品溶液浓度 (0.000256、0.00128、0.0064、0.032、0.16、0.8、4.0 $\mu\text{g/mL}$) 进行 ic-ELISA 方法测定, 得到不同浓度氟乐灵标准品所对应的 OD 值。以氟乐灵标准品浓度的对数为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘制标准曲线, 并确定其灵敏度 (IC_{50}) 和线性范围 ($IC_{20}\sim IC_{80}$), 从而评价所建立方法的灵敏度和线性范围。

1.2.7 交叉反应测定

在最优的工作条件下, 本研究选取与氟乐灵结构或功能类似的 20 种药物 FCRL、G-031 和 IPPL 等进行抗特异性测定, 通过各种药物的标准曲线分别得到其 IC_{50} 值。交叉反应率越高, 特异性越差, 交叉反应率 (CR) 计算公式如下:

$$CR / \% = \frac{IC_{50}(\text{氟乐灵})}{IC_{50}(\text{结构类似物})} \times 100\%$$

式中: IC_{50} (氟乐灵) 为引起 50% 抑制的金刚烷胺浓度 (ng/mL), IC_{50} (结构类似物) 为引起 50% 抑制的结构类似物浓度 (ng/mL)。

1.2.8 样品前处理方法、添加回收实验与仪器确证

1.2.8.1 样品前处理

取鳗鱼、对虾、大豆油、大豆作为检测样品。样品去皮去壳并搅碎, 取 2.5 g 加入 10 mL 乙腈, 震荡 15 min, 6000 r/min 离心 3 min。取 5 mL 上清液到净化管中, 涡旋 1 min 后振摇 15 min, 6000 r/min 离心 3 min, 取 2 mL 上清液于 15 mL 离心管中, 45 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴氮吹近干, 加入 1 mL 正己烷定容, 涡旋过膜装瓶上机。将净化后的溶液用氮吹仪氮吹完全, 然后根据所需浓度加入一定量的甲醇和 PBS 缓冲溶液超声提

取这些溶液 30 min。

1.2.8.2 添加回收实验

按照方法 1.2.7.1 处理样品, 在超声提取的溶液中添加一定量的标准工作液, 使之含量分别为 0.08 $\mu\text{g/g}$ 、0.5 $\mu\text{g/g}$ 、0.1 $\mu\text{g/g}$ 的加标样品。用建立的 ic-ELISA 方法进行测定, 每个样品重复 3 次并计算出回收率和变异系数 (变异系数 (CV) = 标准差/平均数)。

1.2.8.3 仪器方法确证

采用气相色谱法 (GC-ECD) (NY/T 761-2008) 进行仪器确证。GC-ECD 分析条件: DB-1701 色谱柱 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm), 进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$, 进样方式为不分流进样, 进样量 1 μL , 载气为氮气 (99.999%), 恒定流量 1.0 mL/min, 程序升温: 初温为 60 $^{\circ}\text{C}$, 保持 0.5 min 后, 以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 200 $^{\circ}\text{C}$, 然后以 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 270 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min。在鳗鱼、对虾、大豆、大豆油的空白样品中添加一定量的标准工作液, 使之含量分别为 0.08、0.5、0.1 $\mu\text{g/g}$ 的加标样品, 按照方法 1.2.7.1 处理样品, 采用气相色谱法测定样品的抗体浓度, 每个样品设 3 个重复, 计算回收率和精密度。

1.2.9 数据处理

采用 Microsoft Excel、origin 8.5 对数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 半抗原的合成鉴定

半抗原的合成采用 2-吡咯烷酮与正溴丙烷 70 $^{\circ}\text{C}$ 下油浴搅拌过夜后获得黄色油状物, 碱性水解过夜, 加入 3,5-二硝基-4-氯-三氟甲苯, 反应 1 h, 获得半抗原 2C (结构见图 1)。将制备的半抗原 2C 分离纯化, 采用薄层分析法进行初步鉴定 ($R_f=0.8$) 之后, 通过高分辨质谱 (MS) 和核磁共振氢谱 (NMR) 进行精细结构鉴定。 $^1\text{H-NMR}$ 图谱中 (图 2(a)), δ 为 8.00×10^{-6} 的 s 峰是苯环上的两个氢; δ 为 $3.07 \times 10^{-6} \sim 2.98 \times 10^{-6}$ 的 m 峰归属于与氮相连的亚甲基上的氢; δ 为 $2.94 \times 10^{-6} \sim 2.86 \times 10^{-6}$ 的 m 峰归属于二级碳上的氢; δ 为 2.34×10^{-6} 的 t 峰归属于与羟基邻位的亚甲基上的氢, 耦合常数为 7.2 Hz; δ 为 $1.89 \times 10^{-6} \sim 1.79 \times 10^{-6}$ 的 m 峰归属于与羟基间位的亚甲基上的氢; δ 为 1.55×10^{-6} 的 dd 峰归属于与甲基邻位的亚甲基上的氢, 耦合常数为 7.5 Hz; δ 为 0.81×10^{-6} 的 t 峰归属于甲基上的氢, 耦合常数为 7.4 Hz。电子轰击质谱 (EI-MS) 图谱中 (图 2 (b)) 出现了一组预期的同位素分子离子峰, 其高度是 380.1 (m/z , M^+)。根据其核磁共振氢谱与质谱数据, 证明半抗原 2C 制备成功。

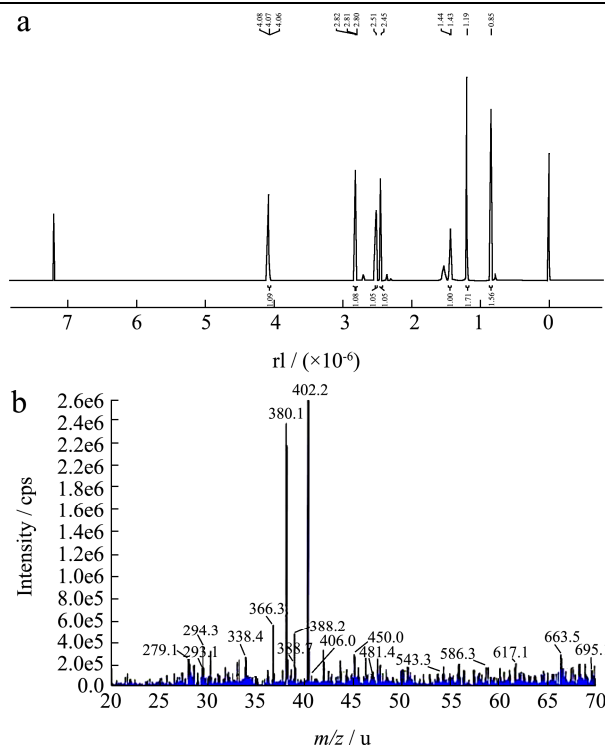


图2 氟乐灵半抗原 2C 的合成

Fig.2 Synthesis of haptent 2C of trifluralin

注：a 为氟乐灵半抗原 2C 的 ¹H-NMR 谱图；b 为氟乐灵半抗原 2C 的质谱图。

2.2 完全抗原的合成鉴定

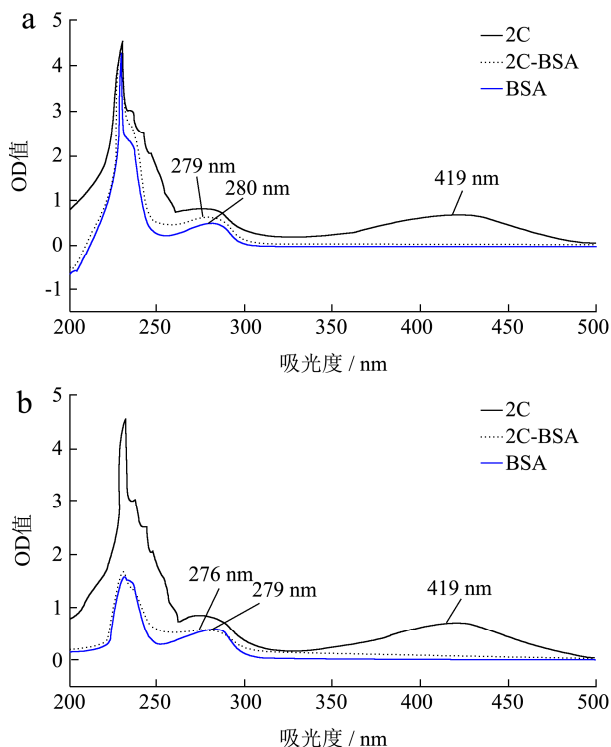


图3 氟乐灵免疫原 (a) 和包被原 (b) 的紫外扫描图

Fig.3 Ultraviolet spectrum of immunogen trifluralin 2C-BSA (a) and 2C-OVA (b)

完全抗原的合成采用碳二亚胺法，通过紫外分光光度计检测，检测数据通过 Origin 8.5 作图，结果如图 3 所示。由图 3 可知，2C、BSA、OVA 在 419 nm、280 nm、279 nm 处具有特征吸收峰，2C-BSA 和 2C-OVA 分别在 279 nm 和 276 nm 处有特征吸收峰，2C-BSA 和 2C-OVA 相对 BSA 和 OVA 的最大吸收峰位置均向左发生偏移，因此初步判定完全抗原偶联成功，后期产生的抗体和建立的检测方法也充分证明完全抗原偶联成功。

2.3 ic-ELISA 方法的优化

本研究对包被原和抗体稀释倍数、包被温度、抗体和标准品稀释液、竞争时间、酶标二抗稀释液这些工作条件进行优化，IC₅₀ 值越低，灵敏度越高，综合考虑 A_{max}、IC₅₀ 和 A_{max}/IC₅₀ 和曲线拟合度，从而得出最优的条件参数。包被原和抗体稀释倍数对 ic-ELISA 影响明显，浓度的过高或过低都会影响抗原抗体的结合，从而降低方法灵敏度，影响 A_{max} 和曲线稳定性。包被原和抗体稀释倍数的优化结果如图 4a 所示，选择 OD 值为 1.0~1.5 的 4 对稀释倍数组合（包被原稀释倍数/抗体稀释倍数：24000/1000、10000/3000、9000/9000、6000/12000）进行分析比较，包被原及抗体稀释倍数均为 9000 倍的 A_{max} 值最大、IC₅₀ 值较小和 A_{max}/IC₅₀ 值最大，综合考虑选择（9000，9000）这个组合作为包被原和抗体的最佳稀释倍数。

ic-ELISA 是一种基于抗原与抗体的生物化学反应，故在合适的温度下，可提高抗原与抗体的结合反应率。本研究比较了 37 °C 和 4 °C 两种包被条件的 A_{max}、A_{max}/IC₅₀ 和 IC₅₀，由图 4b 可知，A_{max} 和 A_{max}/IC₅₀ 均相差不大，但 37 °C 的 IC₅₀ 要比 4 °C 的小，因此选其作为最佳包被温度。

对抗体和标准品稀释液进行优化可以降低空白值，提高方法准确性。本研究将 PBST、PBS、Tris-HCl 三种稀释液两两组合为 9 种搭配，如图 4 (c1-c3) 所示，抗体/标准品稀释液是 Tris-HCl/PBS 溶液的组合 IC₅₀ 较低，A_{max}、A_{max}/IC₅₀ 较高，因此选其作为抗体和药物的最优稀释液组合。

对抗原抗体反应时间进行优化，可以提高方法的灵敏度及重复性，是实验中的关键环节。本研究选取 20、30、40、50 和 60 min 五种竞争反应时间进行分析，结果如图 4d 所示。由图可知，在 40 min 时的 IC₅₀ 较小，A_{max}、A_{max}/IC₅₀ 较大，因此选择 40 min 作为抗原抗体的竞争时间。

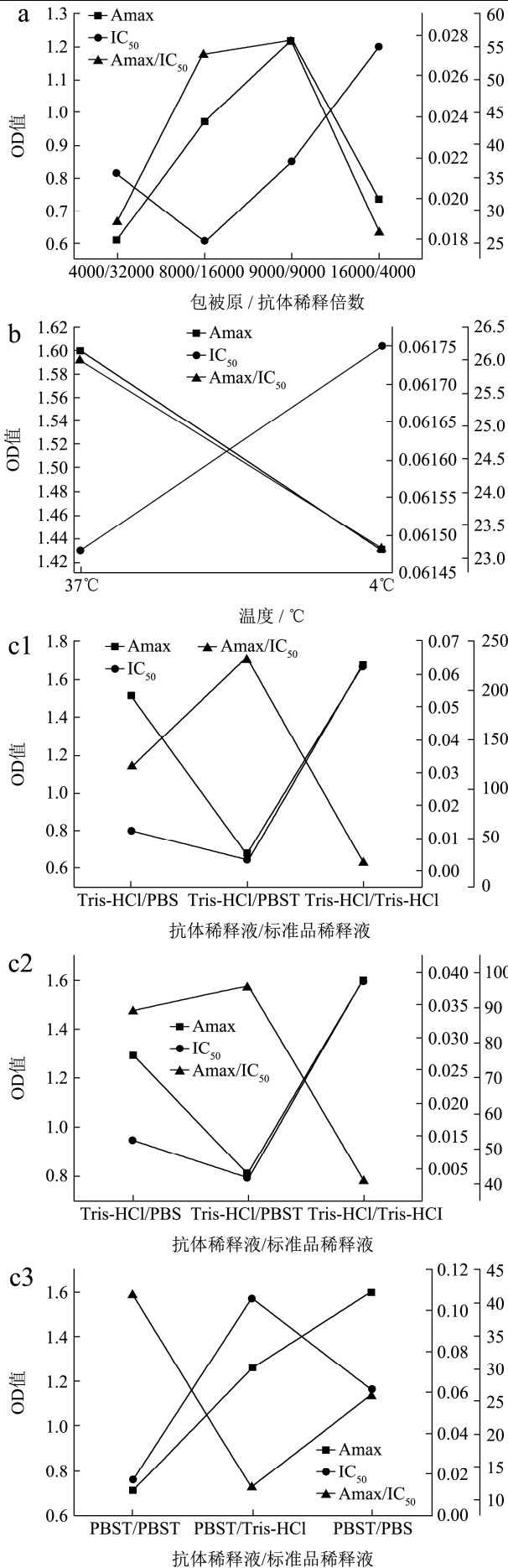


图4 ic-ELISA 方法的优化

Fig.4 Optimization of ic-ELISA method

注：图中（a）表示包被抗原和血清稀释倍数的优化；（b）表示包被温度的优化；（c1）（c2）（c3）抗体和标准品稀释液的优化；（d）竞争时间的优化；（e）酶标二抗稀释液的优化。

在上述优化的条件下，本研究对酶标二抗稀释液进行优化，可提高方法的稳定性和灵敏度。本实验分析了三种不同稀释液（PBS，PBST 和 Tris-HCl）对实验结果的影响，由图4e 可得，酶标二抗稀释液为 PBST 溶液时的 IC₅₀ 值最低，Amax 较高，Amax/IC₅₀ 最高，因此选其作为最佳的酶标二抗稀释液。

2.4 ic-ELISA 标准曲线的建立

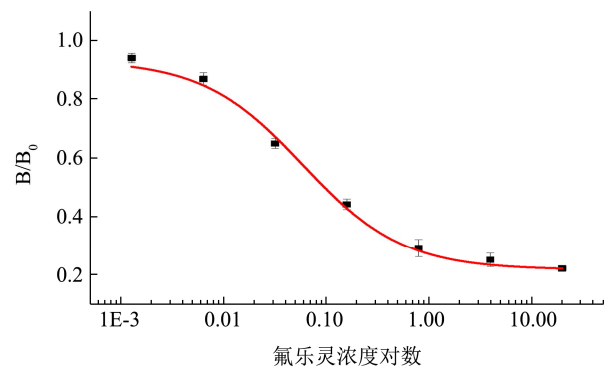


图5 ic-ELISA 检测氟乐灵标准曲线

Fig.5 ic-ELISA standard curve of trifluralin detection

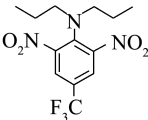
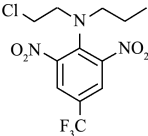
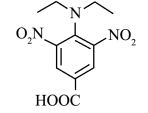
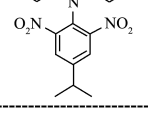
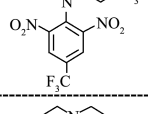
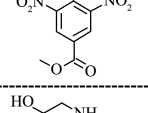
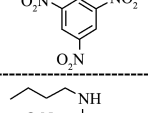
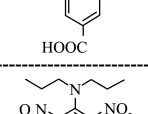
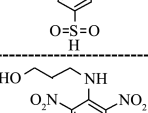
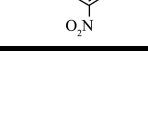
根据上述 ic-ELISA 条件优化结果，得到 PcAb-2C 的包被原与抗体最佳稀释倍数均为 9000 倍，包被温度为 37 °C，最佳竞争反应时间为 40 min，抗体稀释液

为 Tris-HCl, 标准品稀释液为 PBS, 酶标二抗稀释液为 PBST。在此最佳反应条件下绘制标准曲线, 结果如图 5 所示, 得到 PcAb-2C 的灵敏度良好(IC_{50} 为 54.07 ng/mL, 最低检测限为 7.22 ng/mL), 相关系数为 0.99, 曲线拟合度好, 线性范围为 12.56~282.62 ng/mL, 线性范围广。与 Hegedűs 等^[32]测得的灵敏度相比略低 (IC_{50} 为 1.89~15.04 ng/mL), 但也处于良好范围内。

2.5 特异性鉴定

表 1 氟乐灵与 20 种结构类似物的交叉反应数据

Table 1 Cross-reaction data of trifluralin with 20 structural analogues

类似物 编号	分子结构式	PcAb-2C	
		IC_{50} /(ng/mL)	交叉反应率/%
氟乐灵		54.07	100.00
FCRL		93.81	57.64
G-031		141.35	38.25
IPPL		696.4	7.76
PFRL		1161.26	4.66
G-057		1722.49	3.14
E-044		4467.54	1.21
G-053		9684.71	0.56
NTL		16623.37	0.33
E-046		47213.48	0.11

续表 1

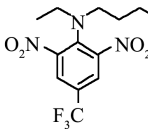
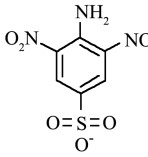
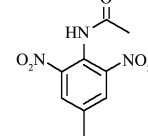
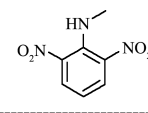
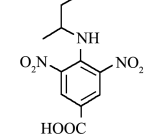
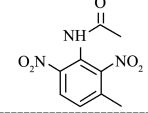
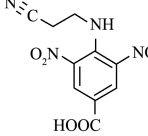
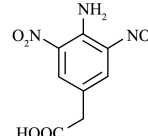
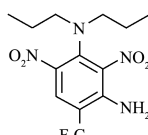
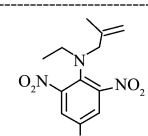
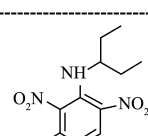
类似物 编号	分子结构式	PcAb-2C	
		IC_{50} /(ng/mL)	交叉反应率/%
BFRL		23875.08	0.02
E-011		-	-
E-480		-	-
E-014		-	-
G-005		-	-
E-473		-	-
G-012		-	-
E-573		-	-
PDM		-	-
EFRL		-	-
PDTL		-	-

表2 ic-ELISA 和 GC-ECD 测定的回收率和变异系数

Table 2 Recovery rate and coefficient of variation determined by ic-ELISA and GC-ECD

样品	加标浓度 (ng/g)	ic-ELISA			GC-ECD		
		测量值/(ng/g)	回收率/%	变异系数 CV/%	测量值/(ng/g)	回收率/%	变异系数 CV/%
鳎鱼	80	78	97.5	7.4	80.2	100.3	3.9
	500	532	106.4	9.6	541	108.2	2.4
	1000	938	93.8	4.8	958	95.8	0.6
对虾	80	82.4	103.0	6.5	73	91.3	2.3
	500	522	104.4	3.9	507	101.4	4.2
	1000	1034	103.4	8.3	999	99.9	5.0
大豆	80	71.8	89.8	7.6	74	92.5	4.6
	500	522	104.4	4.1	527	105.4	1.3
	1000	914	91.4	6.2	926	92.6	1.8
大豆油	80	74.2	92.8	4.9	71.2	89.0	2.8
	500	492	98.4	6.7	498	99.6	1.7
	1000	958	95.8	5.3	936	93.6	3.3

用所建立方法进行检测,测定 IC₅₀ 值并计算交叉反应率,考察所制备抗体对氟乐灵结构类似药物的识别能力,交叉反应率越低,特异性越好。在 20 种与氟乐灵结构或者功能相似的类似药物检测过程中(见表 1),发现本研究所建立的检测方法仅与 FCRL 和 G-031 有较高的交叉反应率(15%以上),与其它 18 种类似物均在 10%以下,甚至一半没有产生交叉反应,说明所建立方法特异性高。与 Hegedűs 等^[32]建立的酶联免疫分析方法相比,本研究选取的结构类似药物范围更广(Hegedűs 等选取药物 17 种),IPPL 和 PDLT 的交叉反应率更低,特异性更好。选取 3 个具有较高交叉反应率的分子(氟乐灵、FCRL 和 G-031)进行分析,发现 FCRL 仅在 N-丙基末端连接了 -Cl(基团体积和电负性增大)和 G-031 仅将三氟甲基换成 -COOH(基团体积增大但电负性降低),造成交叉反应率降低,由此推测 N-丙基和三氟甲基这两个部位的基团体积和电负性改变很可能会影响抗原抗体的识别。

2.6 添加回收实验与方法确证结果

本文以所建立的方法(ic-ELISA)为检测手段,对鳎鱼、对虾、大豆、大豆油进行添加回收实验,结果如表 2 所示。由表可知,ic-ELISA 方法测得的 PcAb-2C 的平均回收率为 89.8%~106.4%,GC-ECD 方法测得的平均回收率为 89.0%~108.2%,两种方法的变异系数均小于 10%。对 ic-ELISA 方法和 GC-ECD 方法的测定结果进行线性回归分析 $R^2=0.99$,相关性好,说明本研究建立的 ic-ELISA 方法准确度能达到检测要求,适用于实际样品中氟乐灵的高通量免疫快速检测。Hegedűs 等^[32]运用所建立的酶联免疫分析方法对

胡萝卜汁、南瓜汁和西红柿汁进行检测,添加回收率约为 50%~333.3%,与之相比本研究准确度更高。

3 结论

本研究利用 3,5-二硝基-4-氯-三氟甲苯与仲胺侧链氨基发生反应制备氟乐灵半抗原,通过碳二亚胺法偶联合成完全抗原并免疫新西兰大白兔获得多克隆抗体 PcAb-2C。基于上述研究,通过优化包被原和抗体的稀释倍数、包被温度、抗体和标准品稀释液等 7 个因素,建立了氟乐灵间接竞争酶联免疫分析方法。结果表明该方法的灵敏度良好(IC₅₀ 为 54.07 ng/mL,最低检测限为 7.22 ng/mL),曲线拟合度好(相关系数为 0.99),线性范围广(IC₂₀~IC₈₀ 为 12.56~282.62 ng/mL),特异性高(20 种氟乐灵结构类似物中只有 2 种药物的交叉反应率大于 15%)。利用本研究所建立方法对大豆、大豆油、对虾和鳎鱼进行实际样品检测,添加回收率为 89.8%~106.4%,采用气相色谱法(GC-ECD)进行验证,添加回收率为 89%~108.2%,两种方法的变异系数均小于 10%,两种方法的一致性较高($R^2=0.99$)。以上数据表明本研究所建立方法具有灵敏度好、特异性好、准确度高优点,达到了国家标准检测要求^[24](食用油中氟乐灵最大残留限量为 50 μg/kg),适用于农(水)产品中氟乐灵农药残留的高通量快速检测,为氟乐灵试剂盒或试纸条的开发提供了理论依据。

参考文献

- [1] Soltani N, Shropshire C, Sikkema P H. Efficacy of trifluralin compared to ethalfluralin applied alone and Co-applied with

- halosulfuron for weed management in white bean [J]. Agricultural Sciences, 2020, 11(9): 837-848
- [2] Soltani N, Shropshire C, Sikkema P H. Efficacy of trifluralin and halosulfuron for weed management in white bean [J]. Canadian Journal of Plant Science, 2020, 100(2): 137-145
- [3] Hooghvorst I, Ribas P, Nogués S. Chromosome doubling of androgenic haploid plantlets of rice (*Oryza sativa*) using antimetabolic compounds [J]. Plant Breeding, 2020, 139(4): 754-761
- [4] Ghasem E, Katrijn V L, Hilde M, et al. Artificial chromosome doubling in allotetraploid *Calendula officinalis* [J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 622
- [5] 潘虎,代艳娜,张一帆,等.气相色谱-串联质谱法测定蔬菜中氟乐灵等 8 种农药的残留量[J].食品安全质量检测学报, 2016,7(7):2926-2930
PAN Hu, DAI Yanna, ZHANG Yiyan, et al. Determination of 8 pesticide residues in vegetables by gas chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2016, 7(7): 2926-2930
- [6] 王文君,陈琼.欧盟最新食品农药残留限量标准研究[J]. WTO 经济导刊,2015,2:90-92
WANG Wenjun, CHEN Qiong. Study on the latest EU food pesticide residue limits [J]. WTO Economic Guide, 2015, 2: 90-92
- [7] 花锦.进出口油料和植物油中 77 种多农药残留检测方法的建立[D].晋中:山西农业大学,2014
HUA Jin. Determination of 77 multi pesticide residues in import and export oilseeds and vegetable oils [D]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2014
- [8] 辛绪红,王晓光.国内外大豆农药残留限量标准分析[J].农业质量标准,2007,1:21-23
XIN Xuhong, WANG Xiaoguang. Analysis of pesticide residue limits of soybean at home and abroad [J]. Agricultural Quality Standard, 2007, 1: 21-23
- [9] Yang S, Zeng K, Luo L, et al. A flow cytometry-based analysis to establish a cell cycle synchronization protocol for *Saccharum* spp [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 1-14
- [10] Coleman N V, Rich D J, Tang F H, et al. Technology, biodegradation and abiotic degradation of trifluralin: a commonly used herbicide with a poorly understood environmental fate [J]. Environmental Science & Technology, 2020, 54(17): 10399-10410
- [11] Maggi F, Tang F H M, Cecilia D L, et al. PEST-CHEMGRIDS, global gridded maps of the top 20 crop-specific pesticide application rates from 2015 to 2025 [J]. Scientific Data, 2019, 6(2): 1-20
- [12] Zwieten L V, Rose M, Zhang P, et al. Herbicide residues in soils - are they an issue? [J]. GRDC Grains Research Update, 2016: 117
- [13] Chowdhury I F, Doran G S, Stodart B J, et al. Trifluralin and atrazine sensitivity to selected cereal and legume crops [J]. Agronomy, 2020, 10(4): 587
- [14] 黄惠威,刘凤银,施迪桑,等.食物和环境中的氟乐灵农药残留检测方法研究进展[J].农产品加工,2020,4:85-92
HUANG Huiwei, LIU Fengyin, SHI Dishen, et al. Research progress on determination methods of trifluralin pesticide residues in food and environment [J]. Agricultural Products Processing, 2020, 4: 85-92
- [15] 孟庆顺.气相色谱法快速测定食用调和油中氟乐灵残留量[J].湖北农业科学,2020,59(S1):435-437
MENG Qingshun. Rapid determination of trifluralin residue in edible blend oil by gas chromatography [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2020, 59(S1): 435-437
- [16] GB/T 5009.172-2003.大豆、花生、豆油、花生油中的氟乐灵残留量的测定[S]
GB/T 5009.172-2003. Determination of Trifluralin Residues in Soybean, Peanut, Soybean Oil and Peanut Oil [S]
- [17] 杨峰山,高梦颖,孙丛,等.4 类除草剂对土壤酶活性的影响研究进展[J].中国农学通报,2021,37(8):97-102
YANG Fengshan, GAO Mengying, SUN Cong, et al. Research progress on the effects of four herbicides on soil enzyme activities [J]. Chinese Agricultural Bulletin, 2021, 37(8): 97-102
- [18] 刘慧慧,任传博,宫向红,等.气相色谱法测定水产品中的氟乐灵[J].食品科学,2012,33(22):214-216
LIU Huihui, REN Chuanbo, GONG Xianghong, et al. Determination of trifluralin in aquatic products by gas chromatography [J]. Food Science, 2012, 33(22): 214-216
- [19] 陈贝贝.氟乐灵降解细菌 D8 的分离、鉴定与降解特性的研究[D].阿拉尔:塔里木大学,2017
CHEN Beibei. Isolation, identification and degradation characteristics of trifluralin degrading bacteria D8 [D]. Alar: Tarim University, 2017
- [20] 李晓玉,付建,隋涛,等.气相色谱-质谱联用检测进出口水产品中氟乐灵残留[J].食品科学,2011,32(16):315-317
LI Xiaoyu, FU Jian, SUI Tao, et al. Determination of trifluralin residue in import and export products by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Food Science, 2011, 32: 315-317
- [21] GB 2763-2019.食品安全国家标准食品中农药最大残留限

- 量[S]
GB 2763-2019. National Food Safety Standards Maximum Pesticide Residue Limit in Food [S]
- [22] Zhang T, Qu Z, Li B, et al. Simultaneous determination of atrazine, pendimethalin, and trifluralin in fish samples by QuEChERS extraction coupled with gas chromatography-electron capture detection [J]. Food Analytical Methods, 2019, 12(5): 1179-1186
- [23] Karasli H, Pavlidis G, Marousopoulou A, et al. Occurrence and distribution of trifluralin, ethalfluralin, and pendimethalin in soils used for long-term intensive cotton cultivation in central Greece [J]. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 2017, 52(10): 719-728
- [24] Maryam H, Mohsen I, Masoud S R. Simultaneous determination of antinonin and trifluralin by electrochemical method and net analyte signal interferent modeling [J]. Microchemical Journal, 2019, 146: 34-40
- [25] Mohsen I, Maryam H, Avat A T, et al. Electrochemical sensing of trifluralin in water by fluconazole-immobilized Fe_3O_4/SiO_2 nanomagnetic core-shell linked to carbon nanotube modified glassy carbon electrode; an experimental and theoretical modeling [J]. Journal of the Iranian Chemical Society, 2018, 15(3): 719-732
- [26] Mohsen J, Mohammad H, Ramin K, et al. Sensitive detection of trifluralin in untreated human plasma samples using reduced graphene oxide modified by polyethylene imine and silver nanoparticles: a new platform on the analysis of pesticides and chemical injuries [J]. Microchemical Journal, 2019, 147: 741-748
- [27] Zhang B, Yan J, Shang Y, et al. Synthesis of fluorescent micro-and mesoporous polyaminals for detection of toxic pesticides [J]. Macromolecules, 2018, 51(5): 1769-1776
- [28] Lai Z, Guo X, Cheng Z, et al. Green synthesis of fluorescent carbon dots from cherry tomatoes for highly effective detection of trifluralin herbicide in soil samples [J]. Chemistry Select, 2020, 5(6): 1956-1960
- [29] 谭庶,杨金易,许吉华,等.鸡肉中金刚烷胺间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J].食品科学,2020,41:304-310
TAN Shu, YANG Jinyi, XU Jihua, et al. Establishment of an indirect competitive ELISA for detection of amantadine in chicken [J]. Food Science, 2020, 41: 304-310
- [30] Wang Z P, Wen K W, Zhang X Y, et al. New hapten synthesis, antibody production, and indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for amantadine in chicken muscle [J]. Springer US, 2018, 11(1): 302-308
- [31] Wu S, Zhu F, Hu L, et al. Development of a competitive immunochromatographic assay for the sensitive detection of amantadine in chicken muscle [J]. Food Chemistry, 2017, 232(232): 770-776
- [32] Hegedűs G, Bélai I, Székács A. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the herbicide trifluralin [J]. Analytica Chimica Acta, 2000, 421(2): 121-133
- [33] Kramer P M, Forster S, Kremmer E. Enzyme-linked immunosorbent assays for the sensitive analysis of 2, 4-dinitroaniline and 2, 6-dinitroaniline in water and soil [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008, 391(5): 1821-1835

(上接第 328 页)

- [18] 许文娟,王振刚,丁葵英,等.QuEChERS/液相色谱-串联质谱法测定5种蔬菜中17种氨基甲酸酯类农药的基质效应研究[J].分析测试学报,2017,36(1):54-60
XU Wenjuan, WANG Zhengang, DING Kuiying, et al. Detection of matrix effects of 17 carbamate pesticides in 5 vegetables by QuEChERS /LC-MS/MS method [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2017, 36(1): 54-60
- [19] 覃国新,劳水兵,莫仁甫,等.通过式固相萃取净化/超高效液相色谱-串联质谱法测定黄瓜、番茄及豇豆中的克百威与涕灭威残留[J].分析测试学报,2019,38(8):967-972
QIN Guoxin, LAO Shuibing, MO Renfu, et al. Determination of carbofuran and aldicarb residues in cucumber, tomato and cowpea by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pass-through solid phase extraction [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2019, 38(8): 967-972