

李 盼, 张晓帅, 邱雨楼, 等. 有机磷农药广谱特异性单克隆抗体的制备及特性分析[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(6): 1415-1421.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.06.031

## 有机磷农药广谱特异性单克隆抗体的制备及特性分析

李 盼<sup>1,2</sup>, 张晓帅<sup>2,3</sup>, 邱雨楼<sup>2</sup>, 闫莉婷<sup>2</sup>, 杨茜茹<sup>2,3</sup>, 刘贤金<sup>2</sup>, 张存政<sup>2</sup>, 许 扬<sup>1</sup>  
(1. 南昌大学食品学院, 中德联合研究院, 江西 南昌 330000; 2. 江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所, 江苏 南京 210000; 3. 兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000)

**摘要:** 本研究以化合物 4-(二乙氧基硫代磷酸酯基)苯甲酸(BPB)为半抗原, 与载体蛋白血蓝蛋白(KLH)偶联后免疫 Balb/c 小鼠。筛选获得 1 株杂交瘤细胞株, 能够分泌广谱识别有机磷农药的单克隆抗体, 而后建立间接竞争酶联免疫检测方法, 并进行谷物添加方法验证。结果表明, 所获得的单克隆抗体对 14 种有机磷农药具有识别作用, 半抑制浓度( $IC_{50}$ )为 0.165~38.274  $\mu\text{g/ml}$ , 交叉反应率(CR)为 5.0%~1 134.0%。其中对蝇毒磷、对硫磷、辛硫磷、啶硫磷 4 种农药具有较高的识别作用,  $IC_{50}$  为 0.165~0.873  $\mu\text{g/ml}$ , 交叉反应率为 214.0%~1 134.0%。利用建立的间接竞争酶联免疫检测方法对玉米、小麦样品进行添加回收验证, 结果表明, 该方法对对硫磷、蝇毒磷、辛硫磷、啶硫磷的回收率为 79.2%~127.3%, 变异系数均小于 11.0%, 所建立的方法可用于谷物中多种有机磷农药残留的快速检测。

**关键词:** 有机磷农药; 单克隆抗体; 间接竞争酶联免疫吸附分析(ic-ELISA)

**中图分类号:** X592 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)06-1415-07

## Production and characterization of broad-specific monoclonal antibody for organophosphorus pesticides recognition

LI Pan<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiao-shuai<sup>2,3</sup>, QIU Yu-lou<sup>2</sup>, YAN Li-ting<sup>2</sup>, YANG Qian-ru<sup>2,3</sup>, LIU Xian-jin<sup>2</sup>, ZHANG Cun-zheng<sup>2</sup>, XU Yang<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Sino-Germany Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330000, China; 2. The Institute of Quality Safety and Nutrition of Agricultural Products, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210000, China; 3. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** Chemical 4-(diethoxyphosphorothioxy) benzoic acid (BPB) represented the general structure of organophosphorus pesticides (Ops) was synthesized and used as hapten coupled with carrier protein KLH for Balb/c mice immunization. Through hybridoma technology, several cell lines were selected and one cell line was proved to possess the ability of secreting monoclonal antibody with broad specificity against multiple Ops. Thereafter, an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) was developed for the determination of multiple Ops and employed for the fortified grain sample detection and method validation. The results showed that the monoclonal antibody could broadly recognize 14

收稿日期: 2017-04-20

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20131333); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(15)1011]

作者简介: 李 盼(1991-), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 主要从事广谱有机磷农药的基因工程抗体研究。(Tel) 18021520996; (E-mail) 578365878@qq.com

通讯作者: 许 扬, (Tel) 0791-88329479; (E-mail) xuyang1951@163.com

Ops, and the cross-reactivity (CR) ranged from 5.0% to 1 134.0%, half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) ranged from 0.165  $\mu\text{g/ml}$  to 38.274  $\mu\text{g/ml}$ . It was found that the monoclonal antibody had higher affinity for the parathion, coumaphos, phoxim and quinalphos binding, and  $IC_{50}$  ranged from 0.165  $\mu\text{g/ml}$  to 0.873  $\mu\text{g/ml}$ , and CR ranged from 214.0% to 1 134.0%. An ic-ELISA was developed and validated by spiked maize and rice samples.

The results showed that the recoveries ranged from 79.2% to 127.3%, and coefficients of variation (CV) were less than 11%. The established method can be used for the determination of multiple Ops in cereal samples.

**Key words:** organophosphorus pesticides (Ops); monoclonal antibody; indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA)

有机磷农药(OPs)是一类广谱、高效的杀虫剂,被广泛应用于农林业生产,因其具有高毒性,所以过度使用会对生态环境和人畜健康造成严重影响<sup>[1-2]</sup>。国家实行了一系列禁、限措施,并强化了对高毒有机磷农药的检测与监管。目前,农药残留的检测方法可分为仪器法、酶抑制法、免疫分析法等。仪器分析法如气相色谱法(GC)、薄层色谱法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)等,检测结果较为准确,但需要从事仪器分析的专业人员,用时较长,难以实现现场快速筛查定性。酶抑制法操作简便,但其灵敏度与检测效果不稳定。基于抗体的免疫分析法具有操作简便、灵敏度高、特异性强的特点,已广泛应用于各个领域。本研究拟采用单克隆抗体制备技术,建立可同时识别多种有机磷农药的免疫检测方法。

抗体的特异性使得传统的免疫分析方法多是针对单一抗原的识别,而有机磷农药属于家族类小分子化合物,种类繁多,毒性机理相同,当多种农药同时存在时,即使单个农药残留不超标,仍存在很大的毒性积累风险。因此,对家族类有机磷农药多残留检测方法的研究具有重要意义<sup>[3-7]</sup>。基于免疫分析方法实现有机磷农药的多残留检测也有相关报道,Wang等<sup>[8]</sup>将多种有机磷农药分子与BSA偶联,获得了可同时检测多种农药的宽谱型多克隆抗体,建立的ELISA方法对三唑磷、克百威等多种有机磷农药的最低检测限低于0.01 μg/ml。Xu等<sup>[9]</sup>获得可以识别14种农药的单克隆抗体,并且通过对半抗原结构优化,又合成2种半抗原,进行异源包被,明显提高了对8种农药检测的灵敏度。Xu等<sup>[10]</sup>制备了可识别8种有机磷农药的多克隆抗体,并建立了间接竞争酶联免疫吸附的方法,采用异源包被对对硫磷、蝇毒磷、辛硫磷和啶硫磷的 $IC_{50}$ 分别为0.348 μg/ml、0.013 μg/ml、1.301 μg/ml和0.022 μg/ml。李刚等<sup>[11]</sup>采用杂交-杂交瘤法制备了双特异性抗体,能够检测2种烟碱类农药和3种有机磷农药。此外,借助基因工程技术,重组抗体可实现对多个抗原的识别,通过突变改造,亦可提高抗体的灵敏度、亲和力,增加识别农药的种类<sup>[12-14]</sup>。

本研究拟通过分析家族类有机磷农药的分子结构,保留共有的乙氧基磷酸酯和芳香环,合成通用结构的半抗原4-(二乙氧基硫代磷酸酯基)苯甲酸(BPB),采用杂交瘤技术,制备广谱型有机磷类农药单克隆抗体,并建立间接竞争酶联免疫检测方法,以期有机磷农药多残留检测奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验动物和细胞株 Balb/c 6~8 周龄雌性小鼠购自扬州大学医学中心,SP2/0 骨髓瘤细胞由本实验室保存。

1.1.2 主要材料与试剂 胎牛血清(无支原体、低内毒素)购自杭州四季青生物公司,不完全1640细胞培养液、氨基嘌呤储存液、次黄嘌呤储存液、胸腺嘧啶核苷(HAT)储存液、次黄嘌呤储存液和胸腺嘧啶核苷(HT)储存液均购自 Gibco 公司,聚乙二醇(PEG)、卵清蛋白(OVA)、血蓝蛋白(KLH)、氟式不完全佐剂(FICA)、氟式完全佐剂(FCA)均购自 Sigma 公司,二甲亚砜(DMSO)、四甲基联苯胺(TMB)均购自 Amersco 公司,15种有机磷农药溶液标准品购自天津汇迪生物技术有限公司,氨基青霉素、链霉素均购自山东瑞阳制药有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 免疫原的制备 半抗原BPB的制备方法参考之前的研究<sup>[8-9]</sup>。免疫原BPB-KLH的制备采用活泼酯法<sup>[9]</sup>,称取14.5 mg半抗原BPB溶于1 ml的二甲基甲酰胺(DMF)中,分别加入0.05 mmol *N*-羧基琥珀酰亚胺(NHS)和0.06 mmol *N,N*-二环己基碳二亚胺(DCC),室温避光磁力搅拌过夜后,8 000 r/min离心10 min,收集上清液,为反应液A。称取45 mg KLH溶解于5 ml PBS-CBS(10:1)的缓冲液(pH 8.7)中,为反应液B。将反应液B置于磁力搅拌器上,缓慢滴加反应液A,室温搅拌4 h,反应结束后,将偶联产物于PBS缓冲液中,4℃透析3 d,8 000 r/min离心20 min去除沉淀,上清分装保存于-20℃冰箱中。偶联物采用紫外光谱进行鉴定,半

抗原 BPB 和载体蛋白 KLH 作阴性对照, 甲醇和 PBS 均作空白对照。

**1.2.2 包被原的制备** 称取 14.5 mg 半抗原 BPB 溶于 1 ml DMF, 加入 23  $\mu\text{l}$  三正丁胺, 冷却至 4  $^{\circ}\text{C}$  后加入 7  $\mu\text{l}$  氯甲酸异酯, 搅拌 1 h, 为反应液 A。称取 30.0 mg OVA, 溶于 5 ml PBS 缓冲液 (pH 7.4) 中, 为反应液 B。将反应液 A 于 4  $^{\circ}\text{C}$  下逐滴加入反应液 B 中, 磁力搅拌过夜。反应结束后处理同上, 采用紫外光谱扫描鉴定偶联结果<sup>[15]</sup>。

**1.2.3 免疫小鼠** 将免疫原 BPB-KLH 与等量弗氏完全佐剂 (FCA) 乳化后, 腹股沟处注射小鼠, 1 只 100  $\mu\text{g}$ 。14 d 后, 同样剂量免疫原与弗氏不完全佐剂 (FICA) 乳化后免疫小鼠。以后每隔 14 d 加强免疫 1 次, 每 7 d 尾部静脉采血, 采用间接 ELISA<sup>[16]</sup> 方法检测多抗血清, 当多抗血清效价超过 1 : 10 000 时即可取其脾细胞用于融合。在准备融合的前 3 d, 将免疫原与生理盐水等量混合, 1 只 200  $\mu\text{g}$ , 冲击免疫小鼠。

**1.2.4 单克隆抗体制备及纯化** 参照 DONG<sup>[17]</sup> 的研究方法进行单克隆抗体的制备, 将免疫小鼠的脾细胞与小鼠 SP2/0 细胞融合, 第 3 d 加入 HAT 培养液, 第 7 d 将细胞培养液换成 HT 培养液, 并用间接 ELISA 鉴定阳性孔。采用有限稀释法对阳性孔细胞进行亚克隆筛选, 经 3~4 次筛选后, 呈阳性的孔内细胞即为分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞, 并将其扩大培养, 然后采用饱和硫酸铵沉淀方法纯化腹水单抗。并采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS-PAGE) 检测纯化效果。

**1.2.5 单克隆抗体最佳工作浓度的测定** 采用方阵滴定法确定包被原和单抗最佳工作浓度: 用 PBS 梯度稀释单抗并分别加至 96 孔酶标板中, 1 孔 100  $\mu\text{l}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 用 PBST 洗板 3 次, 1 次 1 孔 250  $\mu\text{l}$ , 然后向酶标板中加入 3% 脱脂牛奶, 1 孔 300  $\mu\text{l}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h, 用 PBST 洗板后, 将系列稀释的单抗分别加入酶标板中, 1 孔 100  $\mu\text{l}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。以未免疫时的血清和 PBS 分别作阴性对照和空白对照, PBST 洗板后, 加入羊抗鼠 IgG-HRP (1 : 5 000 稀释), 1 孔 100  $\mu\text{l}$ , 并将其加入酶标版中 1 孔 100  $\mu\text{l}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, 将显色液加入酶标板中, 1 孔 100  $\mu\text{l}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min, 然后加入 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止液, 1 孔 50  $\mu\text{l}$ , 用酶标仪测定 450 nm 下的 OD 值。

**1.2.6 ic-ELISA 方法的建立与优化** 用 CBS 稀释

包被原 BPB-OVA 至最佳工作浓度, 加入 96 孔酶标板, 1 孔 100  $\mu\text{l}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  包被过夜, 弃包被液, 用 PBST 洗板 3 次, 加入 3% 脱脂奶粉, 1 孔 250  $\mu\text{l}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 1 h, 用 PBST 洗板 3 次。用含甲醇的 PBS 梯度稀释半抗原, 并与最佳工作浓度的单抗等体积混合, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min。将混合液加入到 96 孔酶标板, 1 孔 100  $\mu\text{l}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。用 PBST 洗板 3 次, 每孔加入 100  $\mu\text{l}$  羊抗鼠 IgG-HRP (1 : 5 000 稀释), 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h, 用 PBST 洗板 3 次, 每孔加入 100  $\mu\text{l}$  显色液, 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 15 min, 再加入 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应, 1 孔 50  $\mu\text{l}$ , 450 nm 测定吸光值, 计算各浓度的结合率, 制作抑制曲线<sup>[18-21]</sup>。

$$\text{结合率} = B/B_0 \times 100\%$$

$B_0$  为不加农药或半抗原的 OD 值,  $B$  为加农药或半抗原的 OD 值。

**1.2.6.1 pH 值** 用 CBS 将 BPB-OVA 稀释至工作浓度, 加入酶标板, 4  $^{\circ}\text{C}$  包被过夜, 配制好 pH 值分别为 5.0、6.0、7.4、8.0 和 9.0 的缓冲液, 按照上述方法建立不同 pH 值下的抑制曲线, 通过显色值和  $IC_{50}$  来分析不同 pH 值对 ic-ELISA 反应的影响。

**1.2.6.2 甲醇含量** 用 CBS 稀释包被原 BPB-OVA 至工作浓度, 加入酶标板, 4  $^{\circ}\text{C}$  包被过夜, 用 5%、10%、15%、20% 甲醇含量的 PBS 溶液稀释半抗原, 按照上述方法建立不同甲醇含量下的抑制曲线, 通过显色值和  $IC_{50}$  来分析不同甲醇含量对 ic-ELISA 反应的影响。

**1.2.6.3 离子强度** 用 CBS 稀释包被原 BPB-OVA 至最佳工作浓度, 加入酶标板, 4  $^{\circ}\text{C}$  包被过夜, 配制好离子强度分别为 0.01 mol/L、0.05 mol/L、0.10 mol/L 的缓冲液, 按照上述方法建立不同离子强度条件下的标准曲线, 通过显色值和  $IC_{50}$  来分析不同离子强度对 ic-ELISA 反应的影响。

**1.2.7 单克隆抗体对不同有机磷类农药敏感性的检测** 采用 ic-ELISA 测定单克隆抗体对不同有机磷农药的敏感性<sup>[10]</sup>, 采用方法 1.2.5 中所得的最佳工作浓度以及方法 1.2.6 所得的最佳参数, 用含甲醇的 PBS 梯度稀释农药, 其余操作步骤同上所述。

**1.2.8 玉米、小麦样品加标回收率的检测** 将 HPLC 检测有机磷农药残留为阴性的玉米和小麦碾碎, 称取 1 g 样品置于离心管中, 加入 5 ml PBS 并于水平摇床上震荡 15 min, 离心取上清, 用 0.45  $\mu\text{m}$  滤

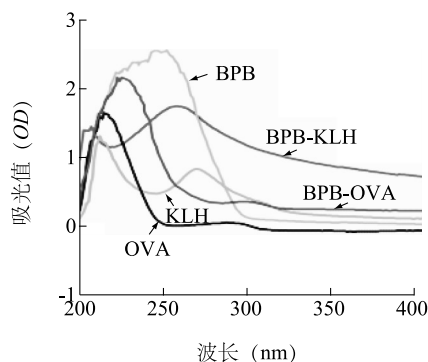


膜过滤,即为样品提取液。往上述样品提取液中分别加入不同浓度的有机磷农药标准品,每个浓度重复 3 次,根据方法 1.2.7 对所添加的农药含量进行测定,计算加标回收率和变异系数<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 完全抗原和包被原的鉴定

图 1 显示,BPB 和 KLH 的最高吸收峰值分别在 262 nm 和 210 nm 处,而完全抗原 BPB-KLH 的最高吸收峰值在 268 nm 处,OVA 的最高吸收峰值在 215 nm 处,而包被原 BPB-OVA 的最高吸收峰值在 236 nm 处。可见合成的完全抗原、包被原与载体蛋白相比,其吸收峰位置发生了明显偏移,表明半抗原与载体蛋白偶联成功。



BPB:4-(二乙氧基硫代磷酸酯基)苯甲酸;KLH:血蓝蛋白;OVA:卵清蛋白。

图 1 免疫原和包被原的紫外全波长扫描

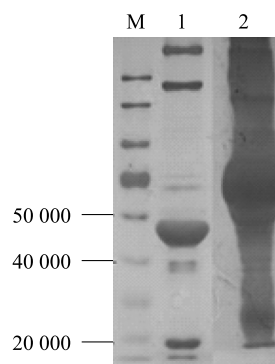
Fig.1 The full-wavelength ultraviolet scan of immunogen and coating antigen

### 2.2 单克隆抗体纯化

采用饱和硫酸铵沉淀法纯化腹水单抗,结果(图 2)显示,1 为纯化后的单抗,抗体重链分子量约为 50 000,轻链分子量约为 20 000,符合预期。结果表明,此方法可以除去腹水中的大部分杂蛋白,初步纯化单克隆抗体。

### 2.3 包被原、抗体最佳工作浓度的确定

采用方阵滴定法测定单克隆抗体和包被原的最佳工作浓度,以 ELISA 检测时显示的吸光值为 1.0 左右时对应的包被原和抗体浓度为最佳工作浓度。单克隆抗体初浓度为 1.800 mg/ml,包被原初浓度为 5.000 mg/ml。最终选择的最佳工作浓度单抗为 0.014  $\mu$ g/ml,包被原为 6.250  $\mu$ g/ml。



M:低分子量蛋白 marker;1:纯化后单抗;2:纯化前腹水。

图 2 饱和硫酸铵法纯化腹水单抗

Fig.2 The purification of ascites by ammonium sulfate precipitation

### 2.4 ic-ELISA 方法的建立与优化

2.4.1 pH 值的优化 选择 5 个不同 pH 值(5.0、6.0、7.4、8.0、9.0),以含有 5% 甲醇的 PBS 缓冲液稀释半抗原 BPB,分析不同 pH 值对试验结果的影响(图 3)。pH 值为 5.0~7.4,显色值随着 pH 值的增加而增加,ic-ELISA 反应的灵敏度逐渐升高。当 pH 值为 8.0 时,显色值虽然较高,但反应灵敏度略低,说明缓冲液 pH 值为 8.0 时,影响单抗与分析物的结合,但有利于单抗与包被原的结合。当缓冲液 pH 值为 9.0 时,反应的显色值和灵敏度急剧下降,说明碱性条件下,单抗与包被原以及分析物的结合都受到了影响。因此选择 7.4 作为最适 pH 值。

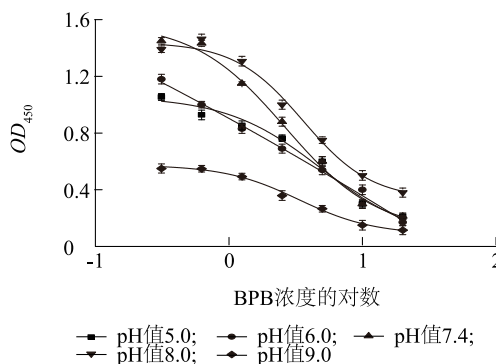


图 3 pH 值对单克隆抗体 ic-ELISA 分析的影响

Fig.3 Effect of pH on the performance of monoclonal antibody by ic-ELISA

2.4.2 甲醇含量的优化 分别配置浓度为 5%、10%、20%、30% 甲醇含量的 PBS 缓冲液(pH 7.4),用于稀释 BPB,分析不同含量的甲醇对试验结果的

影响。结果(图4)显示,随着缓冲液中甲醇含量的升高,显色值逐渐降低,当甲醇含量超过20%时,反应灵敏度降低。当甲醇含量达到30%时,反应几乎停止。可见,甲醇含量过高会影响ic-ELISA反应的进行。所以选择5%的甲醇含量作为ic-ELISA分析的最佳甲醇含量,达到既能溶解农药又可以降低对反应的影响。

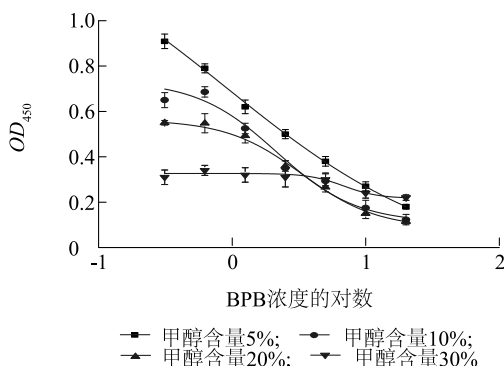


图4 甲醇含量对单克隆抗体ic-ELISA分析的影响

Fig.4 Effect of methanol concentration on the performance of monoclonal antibody by ic-ELISA

2.4.3 离子强度的优化 配制好离子强度分别为0.01 mol/L、0.05 mol/L、0.10 mol/L的反应缓冲液(pH 7.4, 5%甲醇),分析不同离子强度对试验结果的影响。结果(图5)显示,当离子强度为0.05 mol/L时,ELISA反应的显色值较高,但灵敏度较低,当离子强度为0.01 mol/L时,ELISA反应的显色值较低,离子强度为0.10 mol/L时,灵敏度最高,显色值位于正常范围内。所以选择最佳离子强度为0.10 mol/L。

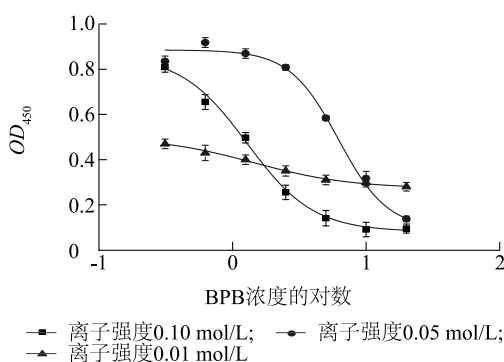


图5 离子强度对单克隆抗体ic-ELISA分析的影响

Fig.5 Effect of ionic strength on the performance of monoclonal antibody by ic-ELISA

## 2.5 单抗对半抗原BPB敏感性测定

在最佳理化参数条件下,采用ic-ELISA方法测定单克隆抗体对BPB的抑制效果,抑制率曲线如图6显示, $y = -24.200 \ln x + 65.246$ ,相关系数  $r = 0.9802$ ,  $IC_{50}$  为  $1.8670 \mu\text{g/ml}$ ,线性范围为  $0.3125 \sim 10.0000 \mu\text{g/ml}$ ,最低检测限为  $0.1500 \mu\text{g/ml}$ 。

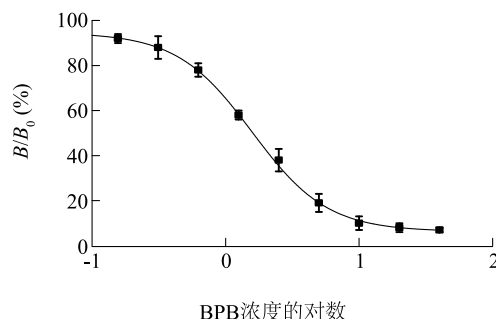


图6 单克隆抗体对BPB的抑制率曲线

Fig.6 Competitive inhibition curve of monoclonal antibody for BPB

## 2.6 单抗对不同有机磷类农药的交叉识别率

单克隆抗体对不同有机磷农药的检测灵敏度如表1显示,其中单抗对对硫磷、蝇毒磷、辛硫磷、啶硫磷有较高的检测灵敏度,其  $IC_{50}$  为  $0.165 \sim 0.873 \mu\text{g/ml}$ ,交叉反应率为  $214\% \sim 1134\%$ 。这几种药的结构与免疫原比较类似,可能更适合抗体识别区的结合界面,更利于分子间作用力的形成,因此具有更高的交叉识别率。例如,单抗对对硫磷的交叉反应高达  $1134\%$ 。单抗对除线磷、丙溴磷有相对较高的检测灵敏度,其  $IC_{50}$  分别为  $2.097 \mu\text{g/ml}$ 、 $2.583 \mu\text{g/ml}$ ,交叉反应率分别为  $89\%$ 、 $72\%$ ,它们的结构跟半抗原虽然类似,但是在芳香环上有取代基的存在,可能会影响抗体与农药的结合。而对于没有芳香环的甲拌磷和乙拌磷,单抗对其识别力较低,  $IC_{50}$  为  $5.000 \mu\text{g/ml}$  左右,交叉反应率分别为  $33\% \sim 37\%$ ,可见苯环在抗体与农药结合的过程中起着重要作用。三唑磷、乙基溴硫磷、毒死蜱有芳香环,但单抗对其检测灵敏度并不高,其  $IC_{50}$  大于  $10.000 \mu\text{g/ml}$ ,可能是苯环上存在较多取代基所导致的,苯环上的取代基越多,农药与单抗的结合能力就越弱<sup>[22]</sup>。特丁硫磷、二嗪农、伏杀磷、马拉硫磷或存在大量侧链,或苯环上含有非常多的取代基结构,可能产生空间位阻效应,进一步影响了抗原抗体的识别与结合<sup>[22]</sup>,导致极低的交叉反应。

## 2.7 添加回收

选取检测灵敏度较高的前4种有机磷农药进行添

加回收试验,分别向玉米样品、小麦样品中添加有机磷农药标准品,每种农药选择 3 个添加浓度测定回收率,并以测定值的相对标准偏差作为变异系数。表 2 显示,玉米、小麦样品中的加标回收率为 79.2%~127.3%,变异系数均低于 11%,表明用该法测定玉米、小麦中的有机磷农药含量具有较高的准确度和精确度。

表 1 单克隆抗体对不同有机磷农药的交叉反应

Table 1 Cross-reactivity of monoclonal antibody for organophosphorus pesticides

农药	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	CR (%)
BPB	1.867	100
对硫磷	0.165	1134
蝇毒磷	0.577	335
辛硫磷	0.682	274
喹硫磷	0.873	214
除线磷	2.097	89
丙溴磷	2.583	72
乙拌磷	5.022	37
甲拌磷	5.578	33
三唑磷	12.414	15
乙基溴硫磷	13.277	14
毒死蜱	15.736	11
特丁硫磷	19.548	10
二嗪农	25.328	7
伏杀磷	38.274	5
马拉硫磷	>100.000	-

$IC_{50}$ : 半抑制浓度; CR: 交叉反应率。

表 2 玉米和小麦样品的加标回收率和变异系数

Table 2 The recovery and coefficient of variation in corn and wheat samples

农药	添加浓度 (mg/kg)	玉米		小麦	
		加标回收率 (%)	变异系数 (%)	加标回收率 (%)	变异系数 (%)
对硫磷	0.01	79.2	7.6	102.4	5.4
	0.10	80.4	7.3	89.5	7.1
	1.00	116.3	4.3	90.5	11.0
蝇毒磷	0.01	88.6	3.4	110.6	3.9
	0.10	97.8	2.8	113.5	4.9
	1.00	112.4	4.5	99.3	6.0
辛硫磷	0.01	80.5	3.3	103.5	3.3
	0.10	98.4	4.2	104.3	5.2
	1.00	120.8	3.2	80.4	5.6
喹硫磷	0.01	79.4	4.0	117.4	1.3
	0.10	95.5	6.1	120.5	6.3
	1.00	127.3	4.9	100.3	7.6

### 3 讨论

制备针对家族类有机磷农药广谱型抗体材料,选用的半抗原一般都是多种有机磷农药的通用结构。本研究所用的半抗原 BPB 是以有机磷农药的通用结构 *O-O* 二乙基硫代磷酸盐与一苯环连接,并在苯环的对位连有 1 个羧基,所制备的单克隆抗体可识别 14 种 *O-O* 二乙基类有机磷农药,虽然识别谱较广,但是对每种农药的特异性并不统一,对于对硫磷交叉反应率高于 1000%,但是对于马拉硫磷等农药的交叉反应率却非常低。有报道指出,广谱型抗体的性能与通用半抗原的结构具有较大的关系。Piao<sup>[23]</sup>在半抗原 BPB 的基础上,在苯环的间位加入 1 个取代基,所制备的抗体对于间位有取代基农药的特异性增强,尤其是对于毒死蜱、杀螟松、二嗪农的特异性较强。Zhao<sup>[5]</sup>将羧基置于苯环的间位,把取代基置于苯环的邻位,制备的抗体对于 *O-O* 二乙基和 *O-O* 二甲基类有机磷农药都具有较高的特异性,但是对于二嗪农的特异性有所下降。由此可见,如果半抗原的羧基位于苯环的对位,抗体对有机磷农药的识别谱更宽但是特异性差,如果羧基位于苯环的间位使得半抗原与多数有机磷农药的结构差异变大,抗体对多种有机磷农药的特异性可能会更一致。如果在半抗原的苯环上引入取代基,虽然可能会提高抗体对某种有机磷农药的特异性,但对抗体的广谱性并不能起到积极的作用<sup>[5]</sup>。因此,本研究后续可重新改造半抗原结构,制备有机磷农药广谱-特异性单克隆抗体。

### 参考文献:

- [1] SONG A E, OKONKWO J O. Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: a review [J]. *Talanta*, 2016, 155: 289-304.
- [2] MORENO J L F, LIÉBANAS F J A, FRENICH A G, et al. Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residues in fat vegetable matrices like avocado by low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1111(1): 97-105.
- [3] LIU Y, WANG C, GUI W, et al. Development of a sensitive competitive indirect ELISA for parathion residue in agricultural and environmental samples [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72(6): 1673-1679.
- [4] 刘建利. 有机磷农药残留微生物降解的研究现状 [J]. *广东农*

- 业科学, 2010, 37(2): 107-110.
- [5] ZHAO F, HU C, WANG H, et al. Development of a Mab-based immunoassay for the simultaneous determination of *O*, *O*-diethyl and *O*, *O*-dimethyl organophosphorus pesticides in vegetable and fruit samples pretreated with QuEChERS[J]. Analytical and Bio-analytical Chemistry, 2015, 407(30): 8959-8970.
- [6] LI Y, ZHAO F, ZHAO L, et al. Development of a broad-specificity immunoassay for determination of organophosphorus pesticides using dual-generic hapten antigens[J]. Food Analytical Methods, 2015, 8(2): 420-427.
- [7] LIANG Y, LIU X J, LIU Y, et al. Synthesis of three haptens for the class-specific immunoassay of *O*, *O*-dimethyl organophosphorus pesticides and effect of hapten heterology on immunoassay sensitivity[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 615(2): 174-183.
- [8] WANG S T, GUI W J, GUO Y R, et al. Preparation of a multi-hapten antigen and broad specificity polyclonal antibodies for a multiple pesticide immunoassay[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 587(2): 287-292.
- [9] XU Z L, SHEN Y D, ZHENG W X, et al. Broad-specificity immunoassay for *O*, *O*-diethyl organophosphorus pesticides: application of molecular modeling to improve assay sensitivity and study antibody recognition[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(22): 9314-9321.
- [10] XU Z L, DONG J X, WANG H, et al. Production and characterization of a single-chain variable fragment linked alkaline phosphatase fusion protein for detection of *O*, *O*-diethyl organophosphorus pesticides in a one-step enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(20): 5076-5083.
- [11] 李 刚. 抗吡虫啉-甲基对硫双特异性单克隆抗体的研究[D]. 南京:南京农业学, 2011.
- [12] ALCOCER M J C, DOYEN C, LEE H A, et al. Properties of polyclonal, monoclonal, and recombinant antibodies recognizing the organophosphorus pesticide chlorpyrifos-ethyl[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(9): 4053-4059.
- [13] RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ E R, LEDEZMA-CANDANOZA L M, CONTRERAS-FERRAT L G, et al. A single mutation in framework 2 of the heavy variable domain improves the properties of a diabody and a related single-chain antibody[J]. Journal of Molecular Biology, 2012, 423(3): 337-350.
- [14] RIAÑO-UMBARILA L, CONTRERAS-FERRAT G, OLAMENDI-PORTUGAL T, et al. Exploiting cross-reactivity to neutralize two different scorpion venoms with one single chain antibody fragment[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(8): 6143-6151.
- [15] ALCOCER M J C, DILLON P P, MANNING B M, et al. Use of phosphonic acid as a generic hapten in the production of broad specificity anti-organophosphate pesticide antibody[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(6): 2228-2233.
- [16] LI Z K, ZHU Y Y, YIN X G, et al. Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the organophosphorus pesticide paraoxon-methyl[J]. Immunological Investigations, 2009, 38(6): 510-525.
- [17] DONG S, ZHANG C, ZHANG X, et al. Production and characterization of monoclonal antibody broadly recognizing cry1 toxins by use of designed polypeptide as hapten[J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(14): 7023-7032.
- [18] LIANG X, XIE R, WANG C, et al. Development of a broad-selective immunoassay for multi-residue determination of type II pyrethroids in West Lake water[J]. Food and Agricultural Immunology, 2013, 24(1): 59-78.
- [19] 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.
- [20] ZENG K, YANG T, ZHONG P, et al. Development of an indirect competitive immunoassay for parathion in vegetables[J]. Food Chemistry, 2007, 102(4): 1076-1082.
- [21] TANG J, ZHANG M, CHENG G, et al. Development of IC-ELISA for detection of organophosphorus pesticides in water[J]. Journal of Environmental Science and Health Part B, 2008, 43(8): 707-712.
- [22] LIU J, ZHANG H C, DUAN C F, et al. Production of anti-amoxicillin ScFv antibody and simulation studying its molecular recognition mechanism for penicillins[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 2016, 51(11): 742-750.
- [23] PIAO Y Z, KIM Y J, KIM Y A, et al. Development of ELISAs for the class-specific determination of organophosphorus pesticides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(21): 10004-10013.

(责任编辑:王 妮)