

分类号

密级

江南大学
博 士 学 位 论 文

题 目: 拟除虫菊酯类农药免疫快速检测方法及其
定量构效模型的建立

英文并列题目: Rapid Detection Immunoassay and Quantitative Structure
Activity Model Analysis for Synthetic Pyrethroids

研 究 生: 陈 秀 金

专 业: 食品营养与安全

研 究 方 向: 食 品 安 全

导 师: 胥 传 来 教 授

指导小组成员: 王 利 兵 研 究 员

学位授予日期: _____

答辩委员会主席: 张 颢 教 授

江 南 大 学

地址: 无锡市蠡湖大道 1800 号

二〇一三年六月

独创性声明


本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含本人为获得江南大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

签 名：陈秉金 日 期：2013年6月8日

关于论文使用授权的说明

本学位论文作者完全了解江南大学有关保留、使用学位论文的规定：江南大学有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文，并且本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。

保密的学位论文在解密后也遵守此规定。

签 名：陈秉金 导师签名：
日 期：2013. 6. 8

摘要

拟除虫菊酯作为一类重要的杀虫剂，广泛地用于农业和卫生业。毒理学研究表明，拟除虫菊酯对环境和人类具有潜在危害，故迫切需要建立拟除虫菊酯的各种检测技术。免疫分析法用于检测拟除虫菊酯具有快速、高通量、多残留和现场检测的优势，因此，现已发展成为拟除虫菊酯残留检测的研究热点之一。

本文设计了 6 种拟除虫菊酯的群选性半抗原，借助计算机软件 Discovery Studio 2.5 和 Gaussian 04 对半抗原和菊酯的结构进行空间模拟和原子电荷计算，选择与菊酯空间结构和电荷分布最匹配的半抗原 1 为免疫半抗原，选择二者差异较大的为包被半抗原。根据模拟和计算结果，选择并合成了半抗原 1, 3, 4, 5。此外，本文还设计并合成了针对氯氟氰菊酯的 2 种特异性半抗原。

将合成的半抗原与载体蛋白（血蓝蛋白、牛血清白蛋白和卵清蛋白）偶联，采用紫外法鉴定后，免疫 BALB/c 小鼠，四免后，测定抗血清的效价和抑制，选择效价高并且抑制好的小鼠进行融合。通过细胞融合和筛选，获得拟除虫菊酯的群选性单克隆抗体和抗氯氟氰菊酯的特异性单克隆抗体。测得拟除虫菊酯群选性单克隆抗体的亲和常数为 3.0×10^8 L/mol，抗体重链和轻链的亚型分别为 IgG₁ 和 Kappa 链。测得氯氟氰菊酯特异性单克隆抗体的亲和常数为 2.8×10^6 L/mol，抗体重链和轻链的亚型分别为 IgG_{2b} 和 Kappa 链。

试验优化了包被原的种类和浓度、缓冲液的离子强度、pH、有机溶剂的种类和含量。利用酶联免疫分析法在最适条件下，测得抗体交叉反应较高六种菊酯的 IC₅₀ 分别为：氯氟菊酯 1.66 ± 0.76 ng/mL、甲氰菊酯 14.03 ± 1.68 ng/mL、顺氰戊菊酯 45.76 ± 4.07 ng/mL、联苯菊酯 191.8 ± 11.2 ng/mL、溴氰菊酯 199.6 ± 10.75 ng/mL、氰戊菊酯 298.5 ± 15.08 ng/mL。该法用于水样的添加回收，三种菊酯（氯氟菊酯、甲氰菊酯和顺氰戊菊酯）平均回收率在 77.3%-111.3% 之间，变异系数小于 15%。

对影响 Au 体系稳定性和试纸条灵敏度的因素（pH、抗体用量及包被原浓度）进行了优化，接着将菊酯群选性抗体标记到金纳米粒子上，通过组装，制备了检测拟除虫菊酯多残留的金标免疫层析试纸条。该试纸条借助便携式的读卡器，对氯氟菊酯的检测限达到了 12.86 ng/mL；该试纸条对氯氟菊酯、甲氰菊酯和顺氰戊菊酯的肉眼检测限分别为 60 ng/mL、200 ng/mL 和 400 ng/mL。

在优化的色谱条件下，利用高效硅胶柱和 Sino-Chiral OD 手性柱经过二次拆分制备了 8 个氯氟菊酯单体、4 个氰戊菊酯单体和 2 个甲氰菊酯单体。此外，利用 Sino-Chiral OD 手性柱并结合文献，确定了单体的构型和纯度。通过测定氯氟菊酯、氰戊菊酯和甲氰菊酯共 14 个单体的抑制曲线来研究菊酯群选性单克隆抗体的立体选择性。结果表明，抗体只能识别氯氟菊酯的单体 6 (CP6, 1S 3S α S) 和单体 7 (CP7, 1S 3S α R)、甲氰的单体 2 (FP2, α S 型) 以及氰戊菊酯的单体 1 (FV1, α S S)，而且 CP7 比 CP6 灵敏度要高很多。

基于菊酯群选性单克隆抗体交叉反应的结果，构建了三种定量构效模型 (QSAR) 即二维定量构效模型 (2D-QSAR)、全息定量构效模型 (HQSAR) 和虚拟定量构效模型

(topomer QSAR)。由 2D-QSAR 模型得出，抗体活性和菊酯的疏水性有很大的相关性，而且疏水性越小，越容易被抗体识别。HQSAR 模型从亚结构水平分析得出，在免疫反应中暴露比较少的片断，对抗体活性也有一定的影响。2D-QSAR 模型和 HQSAR 模型的交叉验证系数 $q^2=0.92$ ，表明这两个模型具有很好的预测能力。构建 topomer QSAR 模型通过计算分子特定片段 (R_2) 的空间场和静电场的等高势，来解释拟除虫菊酯群选择性抗体的交叉反应。

优化了包被原的种类和浓度、封闭剂的种类、缓冲液的离子强度、pH 和甲醇含量。在最适条件下，采用酶联免疫法测得单克隆抗体对氯氟氰菊酯的 IC_{50} 为 13.26 ± 1.23 ng/mL，检测限为 1.83 ng/mL。测得抗体只对氯胺氰菊酯和苯醚氰菊酯有低于 5% 的交叉反应。三种水样（河水、自来水和饮用水）的添加回收率均高于 75%，变异系数小于 12%。

关键词：拟除虫菊酯；单克隆抗体；定量构效模型；酶联免疫法；金标免疫层析试纸条

Abstract

As an important pesticide, synthetic pyrethroids are widely applied in agriculture and hygiene industry. Many toxicological studies indicate that synthetic pyrethroids are potentially harmful to environment and human health. Therefore, it is highly necessary to establish various detection techniques of synthetic pyrethroids. Immunoassays for pyrethroid determination have many advantages including rapid, high-throughput, multi-residues and on-site detection. Therefore, immunoassay has attracted increasing attention in the field of synthetic pyrethroid detection.

In this paper, six general haptens for synthetic pyrethroids were designed. Then Discovery Studio 2.5 and Gaussian 04 software were employed to evaluate the theoretical geometries and electronic distributions of pyrethroids and haptens. Hapten1 that had matched geometries and electronic properties with the analytes was chosen as an immunizing hapten. Other haptens were selected as coating haptens. In addition, two specific haptens for cyhalothrin were designed and synthesized in the present study.

All haptens were conjugated with various carrier proteins containing keyhole limpet hemocyanin, bovine serum albumin and ovalbumin to prepare antigens. Then these conjugates were characterized with a UV-visible spectrometer and used to inject BALB/c mice. Ten days after the last immunization, the titre and inhibition of antisera were tested by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay. Finally, the mouse producing antisera with the highest titer and the lowest 50% inhibition concentration was sacrificed for monoclonal antibody preparation. The process of cell fusion and screening referred to the classic measure. The chosen hybridomas which could steadily secrete anti-pyrethroids (or anti-cyhalothrin) antibody were obtained successfully and ascites were produced using *in vivo* induction. The affinity constant of broad-specificity monoclonal antibody 3E9 against pyrethroids was calculated to be 3.0×10^8 L/mol. The isotype of antibody 3E9 based on the commercial kit indicated that the heavy chain belongs to IgG₁ while the light chain is Kappa. The affinity constant of monoclonal antibody 2C8 against cyhalothrin was calculated to be 2.8×10^6 L/mol. The subtype of antibody 2C8 was characterized that the heavy chain is IgG_{2b} while the light chain is Kappa.

Several important parameters that influenced assay performance were optimized including coating antigens and their concentration, ionic strength, pH, organic solvents and their contents in assay buffer. Under the optimized conditions, six pyrethroids were higher cross-reactivity with ascites 3E9 and their inhibition curves were plotted with IC₅₀ value of 1.66 ± 0.76 ng/mL for cypermethrin, 14.03 ± 1.68 ng/mL for fenpropathrin, 45.76 ± 4.07 ng/mL for esfenvalerate, 191.8 ± 11.2 ng/mL for bifenthrin, 199.6 ± 10.75 ng/mL for deltamethrin, 298.5 ± 15.08 ng/mL for fenvalerate. In the spiked recoveries, the average recoveries were 77.3%-111.3% for the fortified samples. The coefficient of variation values were less than 15%.

Several key factors that affected system stability and the sensitivity of test strip were optimised such as pH, antibody amount and the concentration of coating antigen. Based on

the obtained anti-pyrethroids monoclonal antibody, the immunochromatographic test strip for multi-pyrethroids analysis was prepared using gold nanoparticles as a detector probe, and the test strip for cypermethrin is with the detection limit of 12.86 ng/mL by aid of the portable reader. And the detection limits are of 60 ng/mL for cypermethrin, 200 ng/mL for fenpropathrin and 400 ng/mL for esfenvalerate with naked eyes.

Under the optimized chromatographic conditions, the diastereomers of cypermethrin and fenvalerate have firstly been resolved on an HP silica column, and then injection of separated diastereomers onto Sino-Chiral OD column were ultimately separated completely with reasonable retention times (60 min). The order of elution was established and each configuration was identified by comparison with the related literatures. Under the same conditions, injection of fenpropathrin onto the Sino-Chiral OD chiral system achieved excellent separation of the two enantiomers. The stereoselectivity of antibody 3E9 was determined by comparing standard inhibition curves of fourteen isomers from cypermethrin, fenvalerate and fenpropathrin. Results demonstrated that only two of cypermethrin isomer 6 (CP6, 1S 3S α S) and isomer 7 (CP7, 1S 3S α R), one of fenpropathrin isomer 2 (FP2, α S) and fenvalerate isomer1 (FV1, α S S) were detected, respectively and the general monoclonal antibody against CP7 was higher sensitive than CP6.

Based on cross-reactivity results of anti-pyrethroid monoclonal antibody, three quantitative structure-activity relationship (QSAR) models were constructed including 2D-QSAR (two dimensional QSAR) model, HQSAR (hologram QSAR) model and topomer QSAR model. According to the 2D-QSAR model, there was a significant correlation between antibody activity and pyrethroid hydrophobicity, specifically, synthetic pyrethroids could be recognized more easily when the hydrophobicity was weaker. From the substructure level analysis using HQSAR model, fragments of hapten linked with carrier protein could play an important role on antibody recognition. Both of models showed highly predictive abilities with cross-validation coefficient q^2 values of 0.92, respectively. According to topomer QSAR model, the cross-reactivity of antibody 3E9 can be explained by calculating the steric and electrostatic contours of fragments R_2 .

To establish the enzyme-linked immunosorbent assay for cyhalothrin, coating antigens and their concentrations, blocking agent, ionic strength, pH value and the content of organic solvent in assay buffer were optimized. Under the optimized conditions, an inhibition standard curve for cyhalothrin was plotted with the IC_{50} value 13.26 ± 1.23 ng/mL and with the detection limit of 1.83 ng/mL. The monoclonal antibody 2C8 manifested good specificity to cyhalothrin with little cross-reactivity (<5%) only to tau-fluvalinate or cyphenothrin. The recoveries were more than 75% and the coefficient of variation value was less than 12%.

Keywords: synthetic pyrethroids; monoclonal antibody; the quantitative structure activity relationship; indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay; the immunochromatographic gold-labeled test strip

缩略语表

英文缩写	英文全称	中文全称
SPs	Synthetic pyrethroids	拟除虫菊酯
GC-ECD	Gas chromatography-electron capture detection	气相色谱和电子捕获检测器联用技术
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrum	气质联用技术
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相色谱法
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrum	液质联用技术
Ic-ELISA	Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay	间接竞争酶联免疫吸附法
CE	Capillary electrophoresis	毛细管电泳
IC ₅₀	Fifty percent inhibition concentration	半数抑制浓度
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylammoniumpropyl) carbodiimide hydrochloride	1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基) 碳二亚胺盐酸盐
NHS	N-hydroxy succinimide	N-羟基琥珀酸酐
PBS	Phosphate buffer solution	磷酸盐缓冲溶液
CB	Carbonate buffer solution	碳酸盐缓冲溶液
BB	Borate buffer solution	硼酸盐缓冲溶液
CDI	Carboxyl diimidazole	羧基二咪唑法
TMB	Tetramethyl benzidine	四甲基联苯胺
CR	Cross-reactivity	交叉反应
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砜
CP	Cypermethrin	氯氰菊酯
FP	Fenprothrin	甲氰菊酯
IV	Fenvalerate	氰戊菊酯
LOD	Limit of detection	检测限
OD	Optical density	光密度
OVA	Ovalbumin	鸡卵清蛋白
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
PVP	Polyvinylpyrrolidone P	聚乙烯吡咯烷酮 P
KLH	Keyhole limpet hemocyanin	血蓝蛋白
NMR	Nuclear magnetic resonance	核磁共振
HI	Hypoxanthine-thymidine monophosphate	次黄嘌呤-胸腺嘧啶脱氧苷
HAT	Hypoxanthine-aminopterin-thymidine Monophosphate	次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶脱氧苷
DMF	N,N-dimethylformamide	N,N-二甲基甲酰胺
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
mAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
pAb	Polyclonal antibody	多克隆抗体
QSAR	Quantitative structure activity relationship	定量构效模型
2D-QSAR	Two-dimensional quantitative structure activity relationship	二维定量构效模型

HQSAR	Hologram quantitative structure activity relationship	全息定量构效模型
3D-QSAR	Three-dimensional quantitative structure activity relationship	三维定量构效模型
Topomer-QSAR	Topomer quantitative structure activity relationship	虚拟定量构效模型
CoMFA	Comparative molecular field analysis	分子域比较法
CV	Coefficient of variation	变异系数
OD	Optical density	光密度
CR	Cross-reactivity	交叉反应

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
缩略语表.....	V
第一章 绪 论.....	1
1.1 立题依据.....	1
1.2 拟除虫菊酯类农药的概述.....	1
1.2.1 发展历史.....	1
1.2.2 光学活性.....	2
1.2.3 性质与应用.....	2
1.2.4 毒性.....	3
1.3 拟除虫菊酯残留检测技术的研究进展.....	7
1.3.1 样品预处理技术.....	7
1.3.2 仪器检测技术.....	8
1.3.3 免疫检测技术.....	9
1.3.4 传感检测技术.....	13
1.4 拟除虫菊酯类农药的手性拆分.....	13
1.4.1 高效液相色谱法.....	13
1.4.2 气相色谱法.....	15
1.4.3 毛细管电泳色谱法.....	15
1.5 计算机技术在小分子免疫检测中应用.....	15
1.5.1 辅助设计半抗原.....	16
1.5.2 研究抗原抗体的相互作用.....	16
1.6 主要研究内容.....	17
第二章 计算机辅助设计菊酯的群选性半抗原及其单克隆抗体的制备.....	19
2.1 引言.....	19
2.2 试剂与仪器.....	19
2.2.1 试验试剂.....	19
2.2.2 试验动物.....	20
2.2.3 试验仪器.....	20
2.2.4 缓冲溶液.....	20
2.2.5 培养基.....	20

2.3 试验方法	21
2.3.1 半抗原的设计	21
2.3.2 半抗原的模拟与计算	21
2.3.3 半抗原的合成	22
2.3.4 抗原的合成	23
2.3.5 免疫程序	25
2.3.6 抗血清效价和抑制的测定	25
2.3.7 杂交瘤细胞株的筛选	26
2.3.8 单克隆抗体的制备与纯化	27
2.3.9 单克隆抗体的特性测定	28
2.4 结果与分析	28
2.4.1 半抗原和菊酯的空间模拟和理论计算	28
2.4.2 半抗原的合成和鉴定	30
2.4.3 抗原的紫外鉴定	33
2.4.4 血清的筛选	36
2.4.5 单克隆抗体的特性测定	36
2.5 讨论	38
2.5.1 半抗原的设计和纯度	38
2.5.2 抗原的偶联反应	38
2.5.3 动物个体差异	38
2.6 本章小结	38
第三章 拟除虫菊酯多残留酶联免疫检测方法的建立及其金标试纸条的制备	41
3.1 引言	41
3.2 试剂和仪器	41
3.2.1 试验试剂	41
3.2.2 试验仪器	41
3.3 试验方法	42
3.3.1 Ic-ELISA 方法的条件优化	42
3.3.2 灵敏度的测定	42
3.3.3 交叉反应的测定	42
3.3.4 添加回收试验	42
3.3.5 检测拟除虫菊酯多残留金标试纸条的制备	43
3.4 结果与分析	45
3.4.1 Ic-ELISA 方法的条件优化	45
3.4.2 灵敏度的测定	47

3.4.3 交叉反应的结果	47
3.4.4 水样的添加回收	48
3.5 金标试纸条的制备	49
3.5.1 金纳米粒子的表征	49
3.5.2 抗体标记金纳米粒子条件的确定	49
3.5.3 包被原浓度的确定	50
3.5.4 金标试纸条对三种菊酯检测限的测定	50
3.5.5 交叉反应的测定	51
3.6 本章小结	51
第四章 拟除虫菊酯的手性拆分和定量构效模型的建立	53
4.1 引言	53
4.2 试剂与仪器	54
4.2.1 试剂与材料	54
4.2.2 试验仪器	54
4.3 试验方法	54
4.3.1 氯氰菊酯、甲氰菊酯和氰戊菊酯单体的制备与鉴定	54
4.3.2 菊酯群选择性抗体对单体的抑制测定	55
4.3.3 QSAR 模型的构建	55
4.4 结果与分析	56
4.4.1 氯氰菊酯、氰戊菊酯和甲氰菊酯单体的制备与鉴定	56
4.4.2 菊酯群选择性抗体对各种单体抑制的测定	62
4.4.3 QSAR 模型分析	62
4.5 本章小结	66
第五章 氯氟氰菊酯单克隆抗体制备和酶联免疫检测方法的建立	67
5.1 引言	67
5.2 试剂与仪器	67
5.2.1 试验试剂	67
5.2.2 试验动物	68
5.2.3 试验仪器	68
5.3 试验方法	68
5.3.1 半抗原的合成	68
5.3.2 抗原的合成	71
5.3.3 免疫程序	72
5.3.4 抗血清的筛选	72

5.3.5 单克隆抗体的制备.....	72
5.3.6 单克隆抗体的性能测定.....	73
5.3.7 ELISA 方法的条件优化.....	73
5.3.8 灵敏度的测定.....	73
5.3.9 交叉反应的测定.....	73
5.3.10 添加回收试验.....	73
5.4 结果与分析.....	74
5.4.1 半抗原的合成和鉴定.....	74
5.4.2 抗原的合成和鉴定.....	80
5.4.3 抗血清的筛选.....	82
5.4.4 单克隆抗体的特性鉴定.....	83
5.4.5 ELISA 方法的条件优化.....	84
5.4.6 灵敏度的测定.....	85
5.4.7 交叉反应的测定.....	86
5.4.8 添加回收实验.....	86
5.5 本章小结.....	86
主要结论.....	89
论文创新点.....	91
致 谢.....	92
参考文献.....	93
附 录: 作者在攻读博士学位期间发表的论文与专利.....	102

第一章 绪论

1.1 立题依据

自 20 世纪 80 年代以来,随着剧毒农药(如有机磷和有机氯)的不断淘汰,拟除虫菊酯类农药的研发、生产和应用都得到更多的关注。拟除虫菊酯类农药(Synthetic Pyrethroids, SPs)被广泛用于棉花、蔬菜、果树等作物的害虫防治,对水生生物和非目标节肢动物的毒性比较大,对哺乳类及鸟类的毒性较低,对环境污染小。然而,随着拟除虫菊酯类农药长期大量地重复施用,其危害日益明显,现已引起世界各国研究者的极大关注。

目前,检测拟除虫菊酯残留最常用的方法是气相色谱法(Gas Chromatography, GC),此外,高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC),色谱和质谱的联用技术、毛细管电泳法等也可用于菊酯残留的检测,但这些仪器分析法对样品基质要求高,往往需要复杂的预处理,不仅耗时费钱,而且会造成痕量拟除虫菊酯的丢失;再加上这些仪器分析方法无法满足低成本、快速检测和现场检测的要求。而免疫分析法正好可以弥补这些不足,所以说,建立拟除虫菊酯的免疫检测技术具有很好的发展前景和市场潜力。

建立拟除虫菊酯免疫检测方法的关键是制备亲和力强和灵敏度高的抗体,而重点在于半抗原的设计。一直以来,由于对抗原抗体作用机理以及半抗原空间结构的了解不足,导致半抗原设计具有很大的盲目性,通常需要反复多次的免疫尝试,耗费了大量的时间和资金。而且对于食品专业的人员来说,对目标物进行有机修饰或从头合成半抗原,往往非常困难。另外,拟除虫菊酯是一类典型的手性农药,含有多个旋光异构单体,这对于能够识别手性单体的抗体而言,一种菊酯往往是多种物质的混合物,增大了免疫分析的难度。

为了能够有效地建立拟除虫菊酯的免疫检测技术,可以从两方面入手,一方面对拟除虫菊酯进行手性拆分,制备具有高效杀虫活性的农药单体。另一方面利用不断兴起的计算机软件,辅助模拟和计算半抗原的能量最低构型和电荷分布等参数,合理地设计半抗原结构。同时通过建立定量构效模型(Quantitative structure activity relationship, QSAR),从不同水平上,分析抗体活性和目标物结构参数之间的相关性,借助模型又探索抗原抗体的作用机理,以期为其他手性小分子进行免疫分析提供理论支持。

1.2 拟除虫菊酯类农药的概述

1.2.1 发展历史

拟除虫菊酯类农药是通过改造天然除虫菊素的化学结构而得到的一大类化合物。除虫菊素是除虫菊的有效成分,该化合物具有高效的杀虫活性,但见光分解,限制了菊酯的田间应用。自 20 世纪 40 年代,确定其结构后,便开始了其类似物的合成研究。拟除虫菊酯类农药的发展大致经历了三个阶段:早在 1949 年, M.S.谢克特等合成了第一

个拟除虫菊酯类农药（丙烯菊酯）。接着人们又合成了一些拟除虫菊酯农药如胺菊酯、苯醚菊酯、苯醚菊酯和苯醚菊酯^[1]等。第一代拟除虫菊酯的菊酸部分与天然除虫菊素十分接近，如都含有一个环丙烷的羧酸结构^[2]。通过结构改造，尽管提高了这些化合物熏蒸和驱赶害虫的能力，但仍不能用于田间杀虫剂。直到 20 世纪 70 年代，英国的 Elliott. M 博士通过在菊酸中环丙烷羧酸的乙烯侧链上引入卤素，才研制出第一个对光稳定的拟除虫菊酯氯菊酯^[3,4]，不仅克服了第一代菊酯不能用于农作物的缺点，而且杀虫活性更强，第二代菊酯类农药有溴氰菊酯、溴苯醚菊酯、氯氰菊酯和氰戊菊酯^[5]等。第二代拟除虫菊酯类农药最明显的优势是具有光稳定性，于是很快在农业中得到了广泛的应用，不过这类菊酯存在着高鱼毒和抗性日趋严重的缺陷。后来，研究人员发现在拟除虫菊酯结构的合适位置引入氟原子，不仅可以解决第二代菊酯面临的问题，而且还能兼治鳞翅害虫。例如 1976 年，美国的氰胺公司研制出了第一个含氟拟除虫菊酯氟氰菊酯。接着，英国、德国和法国的也都开发了具有优良杀虫和杀螨活性的拟除虫菊酯农药（如氟氯菊酯^[6]）。目前，国内也能生产多种含氟拟除虫菊酯类农药，例如四氟菊酯、氟氯菊酯、氟氯菊酯和联苯醚菊酯等。第三代菊酯类农药为非羧酸酯性化合物，与天然除虫菊素的化学结构差异大，但是它的杀虫机理与天然除虫菊素相似，所以这类化合物仍然归为拟除虫菊酯。

近年来，新型的拟除虫菊酯杀虫剂仍不断问世，其中有美国陶氏公司开发的 XR-100 和 FMC 公司开发的 profluthrin。日本住友化学公司开发的 γ -profluthrin 和 dimethothrin。我国湖南化工研究院开发的硫脲菊酯和扬农化工股份有限公司开发的倍速菊酯等。随着拟除虫菊酯农药的不断发展，预计国内外对拟除虫菊酯杀虫剂的需求在未来 5-10 年还将处于加速增长的黄金期。

1.2.2 光学活性

大部分拟除虫菊酯的化学结构（见图 1-1）都是由醇部分、酸部分和酯键三部分组成，含有 2-16 个不等的光学异构体。研究表明，不同异构体的杀虫活性和毒性存在明显差异，例如 S,S-氰戊菊酯的活性比其他对映体活性高出 400 倍，且毒性比较低^[7]。如氯菊酯只有 1/4 是高效体；而氯氰菊酯、溴氰菊酯和丙烯菊酯仅 1/8 是高效体，其余为无效成分。因此，对拟除虫菊酯类农药进行手性拆分可以得到高效旋光异构体。例如法国罗素优克程公司拆分制备的溴氰菊酯高效异构体敌杀死，药效比普通溴氰菊酯高 8 倍。尽管为了保护环境，欧洲一些国家已经立法，对具有手性的农药要求使用具有杀虫活性的单一异构体，但由于手性拆分异构体的成本太高和直接合成异构单体的技术尚不成熟，因此，大部分拟除虫菊酯类农药仍以混合消旋体形式出售。

1.2.3 性质与应用

拟除虫菊酯类农药多数呈粘稠状液体或白色固体，相对密度 1.1 g/mL 左右，在水中溶解度通常低于 10 ng/mL^[8]。溶于丙酮、正己烷、乙腈、二甲苯、氯仿等有机溶剂，在酸性和中性条件下稳定，在碱性条件下易发生异构化和降解，遇高温会分解。

据统计，目前世界上共有 70 多种拟除虫菊酯类杀虫剂，在全世界杀虫剂市场中约

占 20% 左右。作为一类高效的杀虫剂，其杀虫活力比以前提高了十倍甚至百倍。

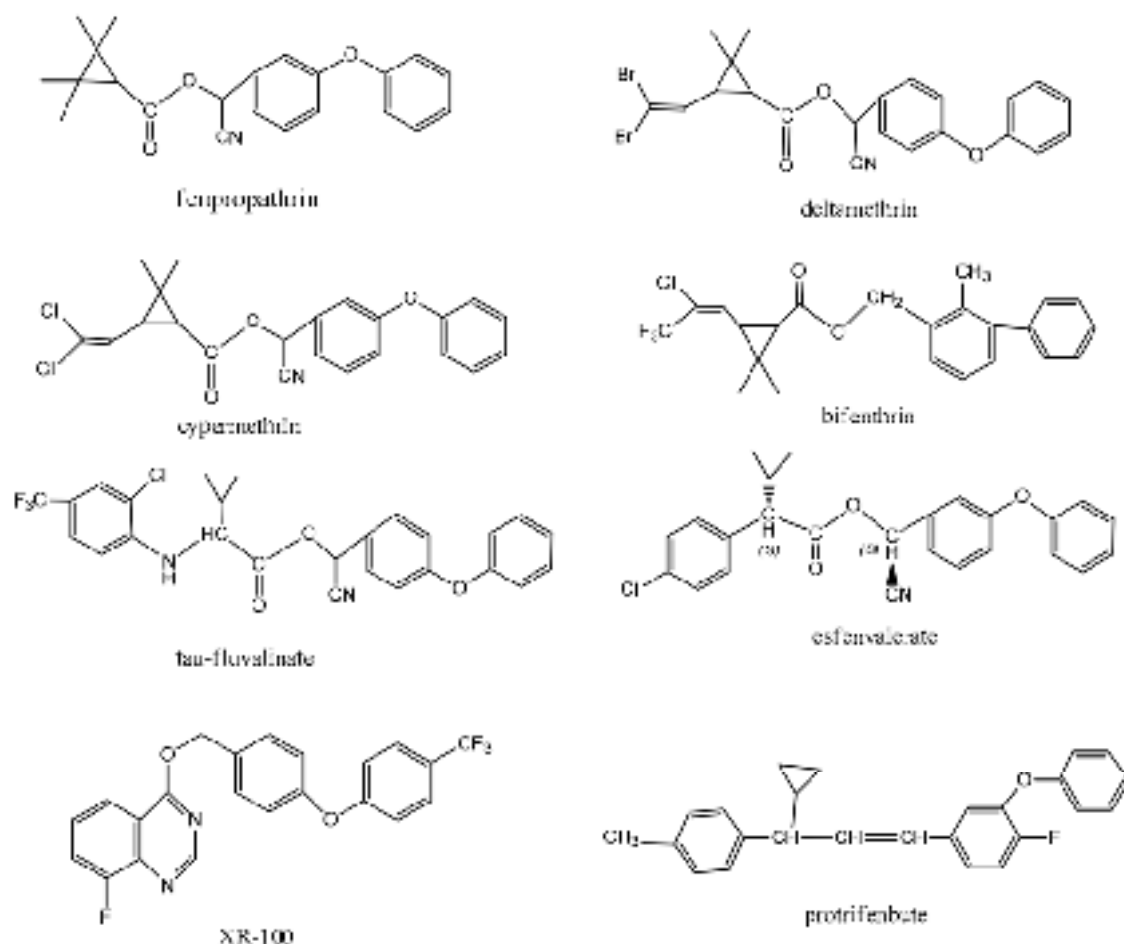


图 1-1 菊酯类农药的结构

Fig 1-1 Chemical structures of pyrethroids

拟除虫菊酯类农药主要用于两个方面，一用于农业，二用于卫生业。农用的拟除虫菊酯杀虫剂有氟氯氰菊酯(cyfluthrin)、联苯菊酯(bifenthrin)、S-氰戊菊酯(esfenvalerate)、氯氟氰菊酯(cyhalothrin)、氯菊酯(permethrin)、甲氰菊酯(fenpropathrin)、氯氰菊酯(cypermethrin)、溴氰菊酯(Deltamethrin)等。其中，氯氰菊酯系列的应用量和销售量最大，如高效氯氰菊酯是由氯氰菊酯的 4 和高效异构体组成，杀虫活性约为氯氰菊酯的 1-3 倍，能有效防治棉铃虫、菜青虫及棉蚜蚊等。高效氯氟氰菊酯（中文名：功夫菊酯等）能够防治蔬菜、棉花、果树、茶叶等经济作物上的大多数害虫。卫生用拟除虫菊酯类农药包括丙烯菊酯(allethrin)、右旋炔戊菊酯、右旋苯醚菊酯(d-phenothrin)、醚菊酯(ethofenprox)和氯菊酯等。其中丙烯菊酯是世界上第一个人工合成的拟除虫菊酯类农药，广泛用于电热蚊香。氯菊酯是人工合成的第一个光稳定型拟除虫菊酯，可用杀灭于蚊、蝇、蟑螂等和防止疟疾及登革热的传播，是 WHO 推荐最早的卫生杀虫剂之一。

1.2.4 毒性

拟除虫菊酯类农药根据其结构是否含有 α -氨基，分为无 α -氨基的 I 型菊酯和有 α -氨基的 II 型菊酯。研究表明，不同类型的拟除虫菊酯杀虫剂，表现出的中毒症状也不同。I 型拟除虫菊酯中毒后主要表现为震颤 (Tremor)，同时伴有兴奋、尖叫等，称为“I 综

合症”。II 型拟除虫菊酯中毒片主要表现为痉挛 (Convulsion)、流口水 (Salivation)，伴随着咀嚼、抓搔和钻洞等行为，称为“CS 综合症”。不过，分型并不绝对，有时可能同时出现。

拟除虫菊酯类农药作为一种亲脂性的杀虫剂，在水中可以直接进入水生动物的鳃和血液中，并在其体内富集，再加上这类杀虫剂在水生生物（如鱼类）体内的排泄和分解作用都比较弱^[9]，造成了这些化合物对水生生物的毒性比较大^[10]。根据拟除虫菊酯杀虫剂的作用机理，这些化合物对于非目标节肢动物毒性也比较强。如菊酯类农药对于蜜蜂也是高毒的 (LD_{50} 0.1-1.0 μg a.i./bee)。相比之下，拟除虫菊酯杀虫剂对哺乳类动物的毒性较低，而对鸟类毒性比哺乳类更低。这是由于菊酯在哺乳动物体内相应酶的作用下很快会分解代谢^[11-14]。不过哺乳动物长期低剂量的接触菊酯，也可能会致病，甚至会导致“三致”。下面从拟除虫菊酯的神经毒性、生殖毒性、生理生化毒性等方面进行介绍。

1.2.4.1 神经毒性

拟除虫菊酯类农药神经毒性的作用方式主要表现在两个方面

对离子通道的影响，包括钠离子通道、氯离子通道、钙离子通道和钾离子通道。研究表明：由于拟除虫菊酯杀虫剂占领了钠离子通道内外两侧之间的疏水区，延迟了钠离子通道的关闭过程，导致了重复后放^[15,16]，从而会干扰昆虫、鱼类或哺乳动物等神经系统的正常功能。拟除虫菊酯对氯离子通道的影响，通过 γ -氨基丁酸 (GABA) 来干扰氯离子通道，通常会缩短氯离子通道的关闭时间^[17,18]，如 Eshleman 等人研究发现溴氰菊酯和氯氰菊酯等对虹鳟鱼脑中基础吸收率的增加有剂量依赖性，并且 γ -氨基丁酸 (GABA) 对这个过程有抑制作用。而 GABA 是氯离子通道的门控性受体，这样就实现了拟除虫菊酯对氯离子通道的干扰。此外，拟除虫菊酯杀虫剂还会影响到钙离子通道的功能^[19,20]。如 Xiao 研究小组利用全细胞的膜片钳技术，研究氰戊菊酯对小鼠精细胞中 T 型钙通道的影响，结果表明氰戊菊酯严重抑制了 T 型钙通道。Symington 等研究发现，溴氰菊酯对大鼠脑突触前神经末梢的靶标位点为 Cav 2.2 钙通道，它能刺激钙离子的大量涌入并增加钙依赖性神经递质的释放。Tian 等^[21]人也采用全细胞膜片钳技术，研究了顺式氯氰菊酯和高效氯氰菊酯对大鼠海马 CA3 区神经元瞬时外相钾离子通道的影响，结果表明：高效氯氰菊酯会导致瞬时外相钾离子通道失活，而顺式氯氰菊酯则会延长了瞬时外相钾离子通道失活后的恢复时间。

对神经递质多巴胺和谷氨酸的影响。如 Nasuti 等^[22]研究了氯菊酯和氯氰菊酯对刚出生 8-15 d 的新生小鼠分泌多巴胺的影响，结果表明，所有小鼠纹状体中多巴胺的含量减少。Symington 等研究了氯氰菊酯和溴氰菊酯对大鼠脑突触的影响，发现这两种菊酯会增加钙离子的流入量和加速谷氨酸的释放^[23]。

1.2.4.2 生殖毒性

拟除虫菊酯杀虫剂对动物生殖毒性的影响也引起了人们的关注^[24]，表现出精子数量减少，精子运动能力下降以及影响幼子的发育等。有人以 SD 品种的雄性成年大鼠为试验动物，用氰戊菊酯连续灌胃 30 d，结果发现，当剂量大于 12 mg/kg 时，大鼠精子的日生成量明显减少，而且精子的日生成量和氰戊菊酯的剂量呈明显的负相关。Luconi

等认为拟除虫菊酯具有雄激素样的作用，影响了雄激素和相应受体的结合，进而会影响到机体的生殖功能^[25]。Ali S. Al-Sarar 等研究了氯氟氰菊酯对成年雄性大鼠的毒性试验，试验动物在三个不同水平（0.2, 0.4, and 0.8 mg/kg/day）连续 6 周口服氯氟氰菊酯。结果表明，实验组大鼠的储精囊重量比对照组明显减少，附睾精子数量减少；而且高剂量组中，氯氟氰菊酯诱导形态异常的精子数量增加^[26]。Farag 等研究了氯氟氰菊酯对子代小鼠的影响，染毒剂量为 10mg/kg/d。结果发现，与对照组相比，实验组子代小鼠的运动能力和游泳能力有明显的差异，说明氯氟氰菊酯染毒亲代，对子代小鼠的生长发育影响比较大^[27]。

1.2.4.3 对免疫系统的影响

近年来，关于拟除虫菊酯农药对动物免疫系统影响的报道也不少。如 El-Sayed 等^[28]以尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)为研究对象，在 15 mg/L 溴氰菊酯浓度下持续暴露 96 h，结果表明：染毒组的白细胞、红细胞数量、血红蛋白百分比、细胞体积容量均增加。Pimpão 等研究认为，溴氰菊酯对多棘钩鲶的新陈代谢系统和免疫系统都有一定的影响^[29]。Righi 等采用流式细胞仪的方法，对雄性的 Wistar 大鼠在高效氯氟氰菊酯 1.0 和 3.0 mg/kg/d 的浓度下连续染毒 7 d 后，发现实验组大鼠吞噬细胞的比例下降，减少了中性粒细胞的氧化爆发以及增加了由金黄色葡萄球菌引发的中性粒细胞氧化爆发，而且这种作用可能通过下丘脑-垂体-肾上腺轴（HPA）间接进行^[30]。

最近，人们还研究了拟除虫菊酯对基因的影响^[31-33]。如 Liu 等研究发现联芸菊酯（BF）对大鼠卵巢颗粒细胞中黄体生成素（LH）排卵基因表达的影响。研究表明，BF 对促性腺激素浓度迅速增加期大鼠的短期作用，影响大鼠卵巢颗粒细胞中黄体生成素（LH）排卵的基因表达。另外，表明 BF 可能通过蛋白激酶 A（PKA）介导的信号转导通路抑制 LH-诱导的 PTGS2 表达。此外，拟除虫菊酯可能对大鼠体内酶也会产生一定的影响^[34-38]。

随着拟除虫菊酯类农药的毒性作用受到越来越多的关注，世界各国纷纷出台了限制拟除虫菊酯农药使用的法律法规，规定了拟除虫菊酯杀虫剂在蔬菜、水果、茶叶、谷物以及肉、蛋、奶等中的最大残留限量。我国新标准 GB2763-2012 中也规定了食品中农药残留的最大限量标准，具体见表 1-1

表 1-1 拟除虫菊酯类杀虫剂（SPs）在食品中的最大残留限量
Table 1-1 Maximum residue limit of SPs in food stuff

菊酯名称	食品种类	食品名称	最大残留限量 (mg/kg)
甲氰菊酯	谷物	小麦	0.1
		大豆	0.1
	油料	棉籽	1
		结球甘蓝、莴苣	0.5
	蔬菜	普通白菜、大白菜、菠菜、芹菜	1
		萝卜	0.5

氧氟氰菊酯和 高效氯氟氰菊酯	谷物	玉米	0.02
		小麦	0.05
		鲜食玉米	0.2
	油料及 制品	大豆	0.02
		棉籽	0.05
		棉籽油	0.02
	蔬菜	茼蒿、普通白菜、菠菜	2
		大白菜、结球甘蓝	1
		芹菜、韭菜	0.5
	水果	番茄、茄子、辣椒	0.2
苹果、梨、柑橘		0.2	
荔枝		0.1	
饮料类	茶叶	15	
食用菌	蘑菇类(鲜)	0.5	
氯氟菊酯和 高效氯氟菊酯	谷物	小麦	0.2
		玉米	0.05
		鲜食玉米	0.5
	油料	大豆	0.05
		棉籽	0.2
		普通白菜、大白菜、菠菜、茼蒿	2
	蔬菜	结球甘蓝	5
		芹菜、韭菜	1
		番茄、茄子、辣椒、豌豆、菜豆、 蚕豆、扁豆、豇豆、食荚豌豆	0.5
	水果	黄瓜	0.2
苹果、梨、橙、柚、柠檬		2	
柑橘、桃		1	
饮料类	荔枝、龙眼	0.5	
	茶叶	20	
	食用菌	蘑菇类(鲜)	0.5
氟戊菊酯和 S-氟戊菊酯	谷物及 制品	小麦	2
		小麦粉	0.2
		全麦粉	2
	油料及制品	玉米	0.02
		鲜食玉米	0.2
		大豆、花生仁、棉籽油	0.1

		棉籽	0.2
		花椰菜、结球甘蓝	0.5
	蔬菜	大白菜	3
		菠菜、普通白菜	1
	谷物及制品	稻谷、麦类、旱粮类、杂粮类、成品粮	0.5
		小麦粉、鲜食玉米	0.2
	油料	大豆	0.05
		花生仁	0.01
		油菜籽、棉籽	0.1
		萝卜、胡萝卜、芜菁、根芹菜、芋	0.2
溴氰菊酯	蔬菜	甘薯、花椰菜、结球甘蓝、大白菜、菠菜、普通白菜、苜蓿	0.5
		番茄、茄子、辣椒	0.2
		苹果、梨	0.1
	水果	柑橘、橙、桔、柠檬、香蕉、菠萝、猕猴桃、荔枝、芒果	0.05
	饮料类	茶叶	10
	食用菌	蘑菇类(鲜)	0.2

1.3 拟除虫菊酯残留检测技术的研究进展

目前，拟除虫菊酯残留的检测技术包括仪器检测技术、免疫检测技术和传感检测技术。不管采用哪种技术，都需要在检测前对样品进行预处理。因此，下面将从四个方面进行介绍。

1.3.1 样品预处理技术

常用的预处理方法有液液萃取、固相萃取、固相微萃取、微波辅助萃取、超声辅助萃取和超临界流体萃取共六种，实际应用中还可能将两种方法结合起来。

液液萃取法是应用最早并且最简单的一种预处理方法，至今大约有150多年的历史。主要用于从土壤、粮食或果蔬等固体样品中提取农药。用于拟除虫菊酯类杀虫剂提取的有机溶剂包括二氯甲烷、正己烷、甲苯和乙酸乙酯。采用两种溶剂混合提取菊酯的组合有丙酮和二氯甲烷、正己烷和二氯甲烷、正己烷和丙酮。液液萃取最大的优点就是操作简单，成本低。但是采用这种提取方法通常不能将菊酯类农药和其他非极性物质分开，而且还会消耗大量有毒的有机溶剂。

固相萃取指样品混合液通过固定相时，待测组分会吸附在固定相，而其他杂质则先流出固定相，再通过改变洗脱条件（更换洗脱液或热解吸），使待测组分被洗出而达到

分离目的。和液液萃取相比, 该法节省了有毒有机溶剂的使用, 重现性好而且杂质含量低。该法已经成功地用于不同水样^[39]、果蔬^[40]和植物油^[41]中菊酯的提取。固相微萃取技术(solid-phase microextraction, SPME)借助一些膜(纤维素膜)将菊酯吸附到其表面, 然后再将其转移到气相或固相色谱中进行分析。Vanessa Casas 等^[42]采用 SPME 技术和气相色谱联用分析水样中菊酯类杀虫剂。结果表明, 萃取温度为 50°C, 采用聚二甲基硅氧烷纤维膜提取, 对于大多数菊酯的检测限达到 1 pg/mL 水平。此外, P. Parrilla Vázquez 研究小组采用 SPME 技术提取黄瓜和西瓜中的菊酯类杀虫剂, 结合高效液相色谱和荧光检测器进行分析^[43]。

微波辅助萃取(microwave-assisted extraction, MAE)利用极性分子能够迅速吸收微波能来加热极性溶剂, 增大了目标物的溶解性, 从而达到萃取样品中目标化合物的目的。与传统振荡提取法相比, 微波萃取具有快速、安全、有机溶剂用量小等优点。F.A. Esteve-Turrillas 等^[27]采用微波辅助萃取土样中的 9 种拟除虫菊酯(胺菊酯、氟氯菊酯、溴氯菊酯、联苯菊酯、氯菊酯、氯氰菊酯和氟胺菊酯), 借助气相色谱联用电子捕获检测器(ECD)或质谱检测器(MS)进行检测, ECD 检测器的检测范围在 1-200 ng/g, MS 检测器的检测范围在 0.3-2 ng/g。

超临界流体萃取(Supercritical-fluid extraction, SFE)指萃取剂在超临界流体状态下萃取目标物, 然后改变条件(降压或升温), 超临界流体会重新变为原来的状态, 进而使待测物得到分离。这些气体包括一氧化氮、二氧化碳、戊烷和氮气。该法优点在于操作时间短。目前, 超临界流体萃取技术已经用于从不同基质中提取拟除虫菊酯类杀虫剂^[45,46]。例如 S. R. Rissato 等人利用 SFE-GC-ECD 建立了土样中农药(包括菊酯)的多残留检测方法。

超声辅助萃取(Ultrasound-assisted extraction, UAE)最大优点是操作简单。和微波辅助萃取(MAE)相比, UAE 比较适合进行样品分析, 而 MAE 更适合大批样品的提取。UAE 也已经成功地用于土壤和污泥中菊酯类农药的萃取^[47,48]。如 Ali 等发现合适的超声时间对于 UAE 是非常重要的, 因为超声萃取时间过长(大于 30 min), 不仅没有增加萃取率, 反而会被重新吸附到土壤中。另外, You 等利用超声辅助萃取建立了淤泥中提取菊酯类农药的方法。另外, 超声辅助萃取菊酯过程中, 菊酯类农药的稳定性有待进一步的研究。尽管 UAE 使用有机溶剂的量比较少, 但随着前处理技术的发展, 期望使用更少量的有机溶剂, 甚至发展到不用有机溶剂。

1.3.2 仪器检测技术

用于菊酯类农药的仪器检测技术包括气相色谱法(Gas chromatography, GC)、液相色谱法(Liquid Chromatography, LC)和毛细管电泳法(Capillary Electrophoresis, CE)。仪器检测的优点在于检测的重复性好和灵敏度高。

目前, 气相色谱法已广泛地用于水样、污泥和食品中拟除虫菊酯农药的检测。如 2010 年, Kuang 研究小组采用免疫亲和柱净化添加 6 种菊酯的猪肉样品, 然后采用 GC-ECD 法进行测定。高效氯氟菊酯和顺式氯氟菊酯的检测限为 2 μg/kg; 氟氯菊酯、溴氯菊酯、甲氧菊酯和氟胺菊酯的检测限为 5 μg/kg^[49]。2011 年, Fco 等人研究

了水样、污泥样和奶样中添加了 12 种菊酯的回收试验，消除了基质干扰，该方法在水样、污泥样和奶样中的检测限分别达到了 0.05-2.59 ng/L, 0.10-87.7 pg/g, 2.29-1071 pg/g, 其优势在于灵敏度高^[50]。Caroline Raeppl 等建立的 GC-MS 方法可以同时对不同类的 31 种农药（包括高效氯氰菊酯、联苯菊酯）进行检测^[51]。2012 年，I. San Román 等利用中空纤维的液相微萃取和气相质谱联用建立了水样中的 9 种菊酯的检测方法，该方法简单、有效而且对环境友好，该法的检测范围在 10-400 ng/mL, 检测限和定量限分别在 2-12 pg/mL 和 3-26 pg/mL^[52]。

目前，液相色谱法也用于不同基质中拟除虫菊酯杀虫剂的检测^[43, 53-55]。如 P. Parrilla Vázquez 等采用熔融石英纤维从地下水中富集分析物（甲氰菊酯、氯氰菊酯、溴氰菊酯、氰戊菊酯、氯菊酯、氟胺氰菊酯和联苯菊酯），通过高效液相色谱和荧光检测器进行分析，定量限为 0.03-0.075 µg/L。Cheng 等采用固相分散萃取法处理猪肝、猪肉、猪心和猪肾，以反相 C₁₈ 柱和紫外检测器结合，对氯氰菊酯和溴氰菊酯检测范围在 0.05-50 µg/mL 之间，该方法对氯氰菊酯的检测限和定量限分别为 0.01 µg/g 和 0.026 µg/g，对溴氰菊酯的检测限和定量限分别为 0.017 µg/g 和 0.056 µg/g。Habib Bagheri et al 利用固相微萃取从水样中富集氟氯氰菊酯、氯氰菊酯和氟氯苯菊酯，并用和荧光检测器相连的高效液相色谱进行分析，建立了一种快速、简单和高灵敏地检测菊酯的方法。Stephen W. C 等报道了超高效液相色谱和质谱联用检测拟除虫菊酯杀虫剂的新方法。试验又用改进了的 QuEChERS（快速、简单、低价、有效、粗放和安全）方法来萃取和净化样品，检测范围在 1-800 µg/kg 之间，定量限为 10 µg/kg。并采用该法首次对香港饮食中鸡蛋、大米和芥菜中菊酯及代谢物进行残留分析。

此外，关于毛细管电泳法分离检测菊酯类杀虫剂报道比较少，如有人采用毛细管电泳法对中国卷心菜中的 6 种拟除虫菊酯进行分离检测，定量限在 0.5-0.8 µg/mL^[56]。

1.3.3 免疫检测技术

鉴于免疫学方法正好可以弥补仪器检测方法的不足，如可实现简便、经济、高通量、和现场检测。因此，许多拟除虫菊酯杀虫剂都已经建立了免疫分析法，其中酶联免疫法发展的最为迅猛，关于检测拟除虫菊酯类农药酶联免疫法（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA）的研究概况见表 1-2。

表 1-2 用于检测拟除虫菊酯残留的 ELISA
Table 1-2 ELISA for the determination of synthetic pyrethroid residues

目标物	ELISAs	抗体类型	IC ₅₀ (µg/L)	LOD (µg/L)	检测样品	文献
氯菊酯	cELISA	mAb	1.5	-	肉	Stanker 1989 ^[57]
	cELISA	mAb	10	1.5	小麦粉	Skerritt 1992 ^[58]
	cELISA	pAb	2.5	-	水	Guomin Shan 2009 ^[59]
丙烯菊酯	lcELISA	pAb	46	-	-	Pullen 1995 ^[60]

生物内 烯菊酯	cELISA	pAb	-	-	草莓	Mohammed 2005 ^[64]
S-生物 丙烯菊 酯	lcELISA	pAb	89	25	水和灰尘	Cao Mengmeng 2012 ^[65]
甲氧 菊酯	cELISA	pAb	20	2.5	-	Ingrid Wengutz 1998 ^[63]
功夫 菊酯	lc-ELISA	pAb	340	93	水	Shi Hai-Yan 2011 ^[64]
联苯 菊酯	lcELISA	pAb	37.2	4.7	水	Gao HongBin 2005 ^[62]
联苯 菊酯	lcELISA	pAb	2000	16		Li Bo 2008 ^[66]
氯氟 菊酯	lcELISA	pAb	-	40	油	Mikaela Nichkova 2009 ^[67]
氯氟 菊酯	lcELISA	pAb	-	-	白酒	Eun-Kee Park 2004 ^[68]
	lcELISA	mAb	20	1.2	沙湖水	Kong Ye 2010 ^[69]
溴氟 菊酯	lcELISA	pAb	21	1.0	河水	Hu-Jiang Lee2002 ^[70]
	cELISA	mAb	0.5	0.08	-	Anne-Laurence Q1998 ^[71]
氟戊 菊酯	lcELISA	mAb	94.5	8.8	水	Jiang Juan 2010 ^[72]
	cELISA	pAb	9	0.5	茶叶	Song Yang 2011 ^[73]
	lc-ELISA	pAb	1190	17	水	Lu Xi-Qin, 2009 ^[74]
顺式氟 戊	lcELISA	pAb	30	3	水	Guomin Shan 1999 ^[75]
氟氟戊 菊酯	cELISA	mAb	-	>1000 200 300 300	水、 土壤、 苹果、 茶	Masanobu Nakata 2001 ^[76]
I型拟 除虫菊 酯	lcELISA	pAb	氟氰酯 30 苯醚菊酯 20	-	工业水	Takaho Watanabe 2001 ^[77]
			氯氟菊酯 78 氟氟菊酯 205 氯氟菊酯 120			
II型拟 除虫菊 酯	lcELISA	pAb	溴氟菊酯 13 顺式氟戊菊酯 6 氟戊菊酯 8 氟胺菊酯 123	-	工业水	Sally K. Mak 2005 ^[78]
	lcELISA	pAb	苯醚氟菊酯 4.58	苯醚氟菊	太湖水	Hao X. L. 2009 ^[79]

			甲氧菊酯 5.62	酯		
			溴氰菊酯 7.08	0.1		
			氯氰菊酯 10.72			
			氟胺氰菊酯 19.95			
			顺式氰戊菊酯 28.18			
			氯氰菊酯 23.2			
	lcELISA	pAb	溴氰菊酯 24.5		西湖水	Liang Xiao 2011 ^[80]
			顺式氰戊菊酯 25.1			
			溴氰菊酯 20			
			氯氰菊酯 16			
	cELISA	pAb	氟胺氰菊酯 11		桃子、绿茶	Lu Yang 2010 ^[81]
			氰戊菊酯 15			
			甲氧菊酯 20			
			氟胺氰菊酯 1.3			
	lcELISA	pAb	氯氰菊酯 2.3		蜂蜜	Kuang Hua 2009 ^[82]
			氯氰菊酯 2.2			
			甲氧菊酯 18.5			
			≤5(溴氰菊酯、氯氰菊酯、氟胺氰菊酯、氰戊菊酯、苯醚菊酯、氯菊酯、甲氧菊酯、氯氰戊菊酯)			
I 型和 II 型	dcELISA	mAb		-	河水	Wang Junping 2011 ^[83]
			20 (氟菊酯、氯氰菊酯、功夫菊酯、溴氰菊酯和苯醚菊酯)	1.5	饮用水	Zhang Qi 2010 ^[84]

说明: cELISA 代表竞争酶联免疫吸附法; lcELISA 代表间接竞争酶联免疫吸附法; dcELISA 代表直接竞争酶联免疫吸附法; pAb 代表多克隆抗体; mAb 代表单克隆抗体; I 型拟除虫菊酯: 不含有 α -氰基; II 型拟除虫菊酯: 含有 α -氰基; IC₅₀: 半量抑制浓度; LOD: 检测限。

大多数拟除虫菊酯类农药属于小分子化合物 (Molecular weight, Mw<1000), 不具有免疫原性, 即直接免疫动物不会发生免疫反应, 往往需要和载体蛋白偶联后, 才能作为免疫原。而拟除虫菊酯本身没有羧基、氨基、羟基和巯基等活性基团, 无法和蛋白质直接反应, 所以, 需要通过改造菊酯合成半抗原或者从头合成菊酯类似物。半抗原设计的合理与否直接决定了抗体制备的成败。设计菊酯半抗原可以从以下四个方面进行: 一通过氧化氯氰菊酯 (或苯醚氰菊酯) 双键, 在分子的环丙烷部分接上一个羧基臂。这种半抗原的合成路线最简单, 往往通过一步反应, 就可以获得目标物。而且反应过程中不需要使用剧毒的氰化物。二 将菊酯分子中的氰基水解后, 连接一个羧基臂; 这种半抗原的合成路线往往需要 3 步反应, 而且也不需要使用剧毒的氰化物。三 在拟除虫菊酯的苯环部位连上一个氨基臂 (或羧基臂); 这种半抗原的合成过程复杂, 连接氨基臂通常需要 4 步以上反应步骤; 而连接羧基臂, 通常需要七步反应, 而且有些中间产物产率极低, 难度非常大, 非专业有机合成人员很难完成。四 在上述半抗原的基础上连接氨

基臂（或羧基臂）。此外，由于拟除虫菊酯杀虫剂一般含有 2-16 个不等的旋光异构单体，所以用同源包被进行筛选时，得到抗体的灵敏度比较低。因此，在制备拟除虫菊酯的抗体时，往往需要合成多种的半抗原，通过建立异源的 ELISA，提高检测拟除虫菊酯类农药的灵敏度。

在过去的二十几年中，国外已经建立了氯菊酯、丙烯菊酯、生物丙烯菊酯、甲氧菊酯、氟氯菊酯、溴氯菊酯、氰戊菊酯、顺氰戊菊酯和氯氰戊菊酯的酶联免疫法。而国内对菊酯农药的免疫分析起步比较晚，最早在 2006 年，中国农业大学的高宏斌博士首次建立了氯氟氰菊酯基于水样的酶联免疫检测方法。后来，南京农业大学的卢希勤和施海燕、李志茹、扬州大学的骆爱兰、农科院油料所的孔晔等分别建立了生物丙烯菊酯、甲氧菊酯、联苯菊酯、溴氯菊酯和氰戊菊酯的免疫检测方法。

同时，国内外也建立了拟除虫菊酯类农药的多残留免疫分析方法。国外最早于 2001 年，Takaho Watanabe 等建立了工业水中 2 种 I 型菊酯（氯菊酯和苯醚菊酯）的酶联免疫分析方法。2005 年，Sally K. Mak 建立了 7 种 II 型菊酯的酶联免疫分析方法，包括氯氟菊酯 78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、氟氯菊酯 205 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、氯氟菊酯 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、溴氯菊酯 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、顺式氰戊菊酯 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、氰戊菊酯 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、氟胺菊酯 123 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。目前，由于 I 型拟除虫菊酯的使用量比较少，所以，国内关于拟除虫菊酯的多残留酶免疫分析都是针对含有 α -氟基的 II 型拟除虫菊酯。2009 年，中国农业大学的匡华等人以 3-间苯氧苯甲酸为原料合成了筛选性的半抗原，和载体蛋白偶联后，免疫新西兰大白兔，获得了 5 种 II 型拟除虫菊酯的多克隆抗体。2011 年，天津科技大学的 Wang 研究小组也是以 3-间苯氧苯甲酸为原料连接—4C 手臂，偶联载体蛋白，免疫、融合和筛选后，获得了世界上灵敏度最好并且和 II 型拟除虫菊酯交叉反应最广的单克隆抗体，在优化的条件下，该方法能够识别 8 种不同菊酯包括溴氯菊酯、氯氟菊酯、氟胺菊酯、氰戊菊酯、共醚菊酯、氯菊酯、甲氧菊酯和氯氰戊菊酯，对它们的半数抑制浓度（fifty percent inhibition concentration, IC_{50} ）均小于 5.0 ng/mL 。

除了用酶标记抗体，还可以采用荧光标记抗体，如农科院油料所的李景坤等建立了氰戊菊酯的荧光免疫分析法。研究用谷胱甘肽包裹的量子点标记抗体，建立了水样和蔬菜中氰戊菊酯的检测方法，其 IC_{50} 达到 0.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[85]。

为了提高检测的灵敏度，有人建立了检测拟除虫菊酯的免疫传感器。王美容等将针对氰戊菊酯的抗体偶联到玻璃碳电极，根据氰戊菊酯浓度和阻抗变化之间的相关性建立了检测方法，检测范围在 0.001-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，检测限为 0.8 ng/mL 。该免疫传感器用于茶叶样品中氰戊菊酯的检测取得了满意的效果，该方法的优势在于具有高灵敏度和宽检测范围^[86]。

以上各种免疫分析法虽然操作简单，但不适用于现场检测。因此，有人研制了关于拟除虫菊酯的金标免疫层析试纸条。2009 年，K.R. Kianthi 等利用多克隆抗体建立的 II 型拟除虫菊酯（氯氟菊酯、溴氯菊酯和氰戊菊酯）的快检试纸条。试纸条对不同菊酯的灵敏度分别为 800 ng/mL 、1000 ng/mL 、1400 ng/mL 。试纸条的检测结果可以用肉眼直接观察，特别适合现场检测^[87]，不过金标试纸条检测的灵敏度较差，将来通过制备灵敏度

更好的抗体，来提高金标试纸条的灵敏度。

1.3.4 传感检测技术

随着各种新型纳米材料的出现，检测拟除虫菊酯杀虫剂的新技术也不断涌现。例如 Li 等^[88]利用简单的比色法建立了拟除虫菊酯的检测方法，该法以银包二氧化硅纳米粒子为探针，通过氢键相互作用发生结合，建立了高效氯氟菊酯的定量方法，快速定量氯氟菊酯的浓度达到 1×10^{-6} mol/L。李海兵等^[89]人利用基于荧光纳米传感器的分子印记聚合物，除去模板后，可用于检测水样（前提是样品中不含其它菊酯农药）中的功夫菊酯，检测范围在 0.1-1000 μ M 之间，检测限为 3.6 ng/mL。PL. Abirama Sundari 等人采用一种纳米聚合物和多壁碳纳米管膜修饰玻璃碳电极，该电极对氯氟菊酯、溴氟菊酯和氟戊菊酯的还原能力显示了很高的灵敏度。新建立的传感器用于水样的添加回收^[90]。Peini Zhao 研究小组将化学发光和分子印记结合的传感器用于测定食品基质中的甲氧菊酯。首先制备了甲氧菊酯印记的多孔微球，这种微球的表面和内部可以特异性地吸附和富集甲氧菊酯，试验表明，新传感器测定甲氧菊酯的线性浓度在 5.0×10^{-4} - 1.5×10^{-5} g/mL，检测限达到 3.07×10^{-8} g/mL，实现了高灵敏检测甲氧菊酯的目的^[91]。

综上所述，在检测拟除虫菊酯的各种方法中，气相色谱法和液相色谱法及其联用技术已经在广泛应用，灵敏度高，稳定性好，适用于样品的准确检测；但无法满足拟除虫菊酯经济、快速和现场检测的要求，因此，发展了免疫分析法，如酶联免疫法和胶体金免疫层析试纸条，适用于快速现场检测样品。为了进一步提高检测拟除虫菊酯的灵敏度，还发展了一些检测菊酯类农药残留的新技术。总之，高灵敏、高通量和简便、快速地现场检测，是未来拟除虫菊酯类农药检测的发展方向。

1.4 拟除虫菊酯类农药的手性拆分

近年来，随着手性拆分技术的不断发展，拟除虫菊酯类农药的手性分离也有了巨大的进步。拟除虫菊酯类农药的色谱拆分方法包括高效液相色谱法（HPLC）、气相色谱法（GC）、毛细管电泳色谱（Capillary Electrophoresis chromatography, CEC）等。

1.4.1 高效液相色谱法

由于 HPLC 载样量大，可以直接分离，重现性好，适用范围广，具有多种检测器，如用于专门检测手性物质的旋光检测器或圆二色散检测器，是目前手性分析最主要的方法之一。用于拟除虫菊酯类农药手性分离的 HPLC 手性固定相主要有刷型，多糖类和环糊精类 3 种。

1.4.1.1 刷型手性固定相

刷型手性固定相是小分子的手性选择因子键合到固相载体上而形成的，可用于对映体的分析和制备。在手性液相色谱领域中，Pirkle 型手性固定相是研究最早、用量最大、适用范围最广、对手性识别机理研究最深入的一类手性固定相。1980 年，Pirkle 研究小组首次报道了 3,5-二硝基苯甲酰基苯甘氨酸衍生物（也称 Pirkle Type 1 A 或 DNBPG）^[92]。随后，Lisseter 等^[93]用 DNBPG 手性柱对菊酯类农药对映体进行拆分，结果表明，氯氟

菊酯分离为八个峰，氯氟菊酯分为四个峰，氟氯菊酯分出的八个峰有两峰并肩，S-氟氯戊菊酯和氟苯醚菊酯被分为四个峰，胺菊酯(tetramethrin)也被顺利拆分，右旋丙烯菊酯很容易被完全分离，不过大部分峰都没有实现基线分离。

后来研究发现，使用两根手性柱或者用硅胶柱和手性柱串联可以实现氯氟菊酯 8 个单体的基线分离。如日本的 δi 等人串联了 OA-4600 和 OA-4700，实现了氯氟菊酯 8 个单体的完全分离^[94]。2005 年，Liu 等使用非手性柱和 Sumichiral OA-2500-I 手性柱串联方式对顺式联苯菊酯、氯菊酯实现了对映体的完全分离^[95]。2009 年，Jing 等人采用串联的 Chirex 00G-3019-OD 柱和梯度洗脱流动相（正己烷/二氯乙烷/乙醇）对氯氟菊酯和氟氯菊酯对映体分离进行了研究，通过嵌入式激光旋光计和紫外检测器进行检测，实现了氯氟菊酯和氟氯菊酯 8 种对映体的基线分离^[96]。Li 等采用 Chiralcel OD 柱对土壤中甲氧菊酯和氰戊菊酯异构体进行分离测定，并对土壤中甲氧菊酯和氰戊菊酯异构体的不对称降解和手性稳定性进行了研究^[97]。2010 年，Xu 等^[98]以 Chiralcel OD 或 Chiralpak AD 柱为固定相，采用圆二色散检测器进行检测，实现了 β -氯氟菊酯对映体的基线分离。同时研究了温度和极性改进剂对对映体分离效果的影响，结果表明，在 20°C 和低浓度极性改进剂条件下分离效果较好。

1.4.1.2 多糖类手性固定相

用于手性固定相的多糖类天然手性高分子聚合物中，纤维素及其衍生物应用的最广泛。其手性识别机理和多糖分子螺旋型沟槽结构及衍生化官能团的 π - π 作用等有关，这类手性固定相优点是样品容量高。缺点是柱效相对较低，对有些溶剂显示不可逆吸附，涂敷型的固定相易流失。早期 Edward 等人^[99]采用 Chiralcel OD 手性柱（纤维素三（3,5-二甲基苯基）氨基甲酸酯）简称 CDMPC）对氯氟菊酯和氯菊酯对映体分离进行了研究，先在硅胶柱上分离成对映体，然后再用手性柱进行分离，实现了氯氟菊酯 8 个对映体的有效分离。KIM 等采用纤维素衍生物对拟除虫菊酯对映体进行分离，取得了较好的效果，并对其识别机理进行了探索^[100]。Faraoni 使用手性柱和非手性色谱柱（多糖衍生物固定相和“Pirkle”柱）串联的方式对氰戊菊酯和氟氯菊酯对映体进行了完全分离，并将其应用于研究在实验室条件下土壤中氰戊菊酯的选择性降解^[101]。近年来，Ma Yun 等研究了 Chiralcel OJ-H 手性柱分离氰戊菊酯对映体的流动相组成，研究表明：当以 1,2-二氯乙烷，乙醇和正己烷为流动相时，氰戊菊酯的 4 个异构体得到了很好的分离，同时还对氰戊菊酯异构体的水生毒性进行了研究^[102]。

1.4.1.3 环糊精类手性固定相

环糊精（Cyclodextrin, CD）是 D-吡喃葡萄糖单元以 α -1,4-糖苷键相结合而形成的环状低聚糖，可用作色谱固定相和环糊精的衍生化，往往可以提高其手性识别能力。作为色谱固定相的环糊精已经用于菊酯类农药对映体的分离。如 Shishovska M^[103]等研究了以 β -环糊精为固定相对氯菊酯对映体进行分离，在以甲醇和水为流动相的梯度模式下得到了 4 个峰，而且顺式氯菊酯的响应因子是反式的 1.66 倍，说明在实验条件下顺式氯菊酯的分离效果较好。Kuang 等^[49]利用手性 CD-pH 柱对氯氟菊酯的 8 个异构体进行分离，得到了 6 个峰。

尽管采用环糊精类手性柱对拟除虫菊酯类农药对映体的 HPLC 分离报道相对比较少,不过在一定程度上补充了前两大类手性固定相的不足,完善了拟除虫菊酯类农药对映体的分离技术。

1.4.2 气相色谱法

气相色谱法 (GC) 也是一种常用的手性分析方法,具有灵敏度高和选择性好的优点,不足之处是局限于沸点低,稳定性好的手性化合物且不能进行单体制备。由于拟除虫菊酯结构的巨大相似性、缺乏异构体的标准品和热不稳定性,再加上 II 类拟除虫菊酯类农药在水解时会失去氰基。所以利用 GC 对拟除虫菊酯对映体分离分析报道比较少。目前,用于 GC 的手性固定相主要有环糊精类。Kutter 等人在全甲基-CD 手性柱上,拆分了丙烯菊酯和氯氰菊酯的对映体^[104]。Liu 等采用 HP-5 柱和 A-环糊精不对称柱 (BGB-172) 对氯氰菊酯和氟氯氰菊酯对映体和非对映体进行分离,通过标准色谱图对比,氯氰菊酯和氟氯氰菊酯顺式非对映体在 BGB-172 柱上可以得到分离,而反式的非对映体不能完全分离^[105]。Liu 等使用 BGB-172 β -环糊精气相毛细管色谱柱对氯氰菊酯、氟氯氰菊酯、联苯菊酯以及氯菊酯进行了手性分离,除了顺式-联苯菊酯的两个峰达到基线分离外,其他菊酯都没有实现基线分离^[95, 106]。Kuang 等人采用气相色谱/电子捕获检测器 (GC/ECD) 对中国茶叶中氯氰菊酯和联苯菊酯的对映体比例进行测定,也只有顺式联苯菊酯达到了基线分离^[107]。

1.4.3 毛细管电泳色谱法

毛细管电泳法 (CEC) 对拟除虫菊酯的手性拆分报道不多。如 Shea 等^[108]利用毛细管电泳方法,分析的生物丙烯菊酯,甲氰菊酯、苯醚菊酯光学异构体全部达到基线分离。该法是常用的电泳手性分析方式,即可分析带电荷化合物,也可分析中性物质。此外, Fernández V^[109]等人首次采用以环糊精 (CD) 为介质的毛细管胶束电动色谱 (MEKC) 和圆二色谱仪对顺式联苯菊酯的对映体进行分离。驱动手性电泳的发展主要基于非水环境的应用,基于可溶性和稳定性的因素,以弥补水环境的不足。

综上所述,拟除虫菊酯类农药手性拆分主要通过 HPLC 和 GC 来进行。其中 HPLC 手性拆分研究的最多,随着其他类型手性固定相如冠醚类,配体交换类和分子印迹类等继续开发和专门用于检测手性物质新型检测器的出现,高效液相色谱手性拆分在实验室和工业规模中的应用将会更加广泛。和 HPLC 相比,GC 的灵敏度比较高,选择性比较好,但 GC 对反式拟除虫菊酯类农药的拆分一直没有得到解决,限制了它的应用范围。

1.5 计算机技术在小分子免疫检测中应用

免疫分析中,第一个重要的环节就是半抗原的设计。通常半抗原化学结构的微小改变,可能会引起其空间结构较大的变化,结果可能导致抗体制备失败。而且,现在越来越多的小分子需要建立多残留的免疫分析技术,而筛选性半抗原的设计要求更高,再加上对抗原抗体作用机理的了解不多,增大了半抗原设计的难度。目前,半抗原设计仍处于对平面化学结构的相似性,通过大量重复试验,验证半抗原的设计是否合理,白白浪

费了很多宝贵的时间。

为了能够有效地制备抗体和建立免疫学方法，免疫化学家开始借助一些新技术（如计算机软件技术）通过模拟其空间结构和描述其物理化学特征（如静电势）来促进免疫学原理和技术的发展。目前，计算机软件技术已经开始用于免疫学分析领域。主要包括 2 个方面

1.5.1 辅助设计半抗原

从本世纪初，国外就有人开始应用计算机软件进行半抗原的辅助设计。如 2000 年，Roger Galve 等^[110]在研究三氯苯酚的免疫学方法时，利用 Hyperchem 4.0 software 模拟不同半抗原的最低能量构型，并用 Gaussian software 的半经验量子力学法来计算半抗原的电荷分布。通常选择结构相似程度最高的半抗原为免疫半抗原，选择结构差异较大的为包被半抗原，而且预测结果通过试验得到了很好的验证。借助计算机软件建立的免疫学方法，检测限达到 0.2-0.06 ng/mL。2008 年，M. Vass 等在制备氨基脲抗体的过程中，利用密度泛函理论法(Density Function Theory, DFT)计算分子结构的能量，并用 Gaussian 03 软件计算分子结构中的原子电荷和静电势。不仅要求半抗原和分析物的空间结构相近，而且要求分子中原子的电荷性质变化不大，这样才可能得到和分析物结构相吻合的抗体。并根据分子模拟的结果，获得抗体的 IC₅₀ 达到了 0.14 ng/mL^[111]。2011 年，Xu 等利用 O,O-二乙基有机磷的抗体活性值和目标物结构描述符之间的关系建立了定量构效模型 (quantitative structure activity relationship, QSAR)，通过对 QSAR 模型的分析，设计了两个异源半抗原，最终建立了高灵敏的异源 ELISA 方法^[112]。2012 年，Daniel G 等^[113]借助分子模型设计了氟喹诺酮类抗生素的群选择性半抗原，通过试验得到的抗体，能够灵敏地识别 10 种氟喹诺酮类抗生素，其 IC₅₀ 分别为环丙沙星 0.35 μg L⁻¹，恩诺氧氟沙星 0.65 μg L⁻¹，丹诺氧氟沙星 7.31 μg L⁻¹；二氟沙星 0.91 μg L⁻¹，沙拉氧氟沙星 0.96 μg L⁻¹，诺氟沙星 0.78 μg L⁻¹，氧氟沙星 1.84 μg L⁻¹；氟甲喹 3.91 μg L⁻¹；麻包沙星 4.3 μg L⁻¹；恶唑酸 23.53 μg L⁻¹。 综上所述，通过试验证明了利用计算机软件辅助设计半抗原具有很好的预测性。

1.5.2 研究抗原抗体的相互作用

近年来，免疫化学家还将计算机软件分析技术用于解释抗体的交叉反应。如 2007 年，Wang 等利用氟喹诺酮类抗生素群选择性抗体的活性值 (-pIC₅₀) 和分析物结构参数建立了 3D-QSAR 模型，模型的建立应用了分子域比较法 (comparative molecular field analysis, CoMFA)，目的为了解释抗体的交叉反应性^[114]。2010 年，Zhang 等借助 QSAR 模型、回归分析法和分子域比较法 (CoMFA) 研究了环境中多环芳香烃抗体的交叉反应。结果表明，多环芳香烃分子的疏水性 (Log P，也称油水分离系数) 和抗体的相互作用及交叉反应有很大的相关性。CoMFA 分析表明，多环芳香烃分子的空间结构和静电势对交叉反应的作用分别为 40.4% 和 59.6%。而且 QSAR 模型对抗体交叉反应具有很好的预测性^[115]。

此外，借助计算机软件建立的 QSAR 模型，还可用于分析分子结构参数和抗体活性

之间的相关性,探索抗原抗体的作用机理。2011年,Yuan等^[116]人利用苯基脲类除草剂交叉反应结果建立了2D-QSAR和HQSAR模型。研究认为,对抗体识别影响最大的结构参数为苯基脲类除草剂的疏水性(logP);另外对于半抗原和载体蛋白之间的连接臂,尽管在免疫反应中暴露的比较少,但通过亚结构水平分析表明,这些结构对于抗原抗体的相互作用也起着重要的作用。此外,还认为苯基脲类除草剂分子的前沿未占轨道能量参数的也会影响免疫反应。Wang等^[117]人研究了单克隆抗体和玉米赤霉醇类似物的结合能力,采用密度泛函理论(DFT)在B3LYP6-31水平上研究半抗原的分子结构,在分子描述符和抗体IC₅₀之间进行皮尔逊相关性分析。结果表明,分析物的分子表面和抗体识别能力之间具有线性关系。2012年,Wang等^[118]利用距离比较法(Distance Comparison DISCOtech),分子域比较法(CoMFA)和分子相似性指数比较法(Comparative molecular similarity indices analysis, CoMSIA)分析单克隆抗体和磺胺类似物之间结合力,构建了3D-QSAR模型(A three-dimensional quantitative structure-activity relationship model, 3D-QSAR),抗体对磺胺类药物的抑制效果采用荧光偏振免疫法进行测定。结果表明,在药效团模型中,磺胺类药物的2个受氢体、2个供氢体和2个疏水中心对于单克隆抗体结合是必需的。基于分子域比较法(CoMFA)和分子相似性指数比较法(CoMSIA)构建的3D-QSAR模型都具有很好的预测能力。Zhang等^[119]人也通过多重线性逐步回归法、主要因素回归法和偏最小二乘法分析,在多环芳香烃的交叉反应和分子描述符之间建立了QSAR模型。结果表明,多环芳香烃电荷性质和拓扑性质对交叉反应有整体效应,其中摩尔溶解性和分子价连接指数的影响最大。

综上所述,将计算机软件技术用于免疫学分析才刚刚起步,随着免疫学原理的完善和计算机软件技术的不断应用,预计分子模拟在小分子免疫分析中将具有更加诱人的应用前景。

1.6 主要研究内容

1. 计算机辅助设计菊酯的群选性半抗原及其单克隆抗体的制备

根据II型拟除虫菊酯的三部分共同结构和计算机软件的模拟和计算,设计并合成了拟除虫菊酯群选性的免疫半抗原和包被半抗原。

通过免疫和融合,制备了拟除虫菊酯的群选性单克隆抗体。

2. 拟除虫菊酯多残留酶联免疫检测方法的建立及其金标试纸条的制备

优化ELISA的试验条件,建立了检测拟除虫菊酯多残留的酶联免疫分析法。

利用制备的菊酯类群选性抗体,制备了检测菊酯多残留的金标试纸条。

3. 拟除虫菊酯类农药的手性拆分及其定量构效模型的建立

利用HP 硅胶柱和Sino-Chiral OD手性柱对抗体识别能力最好的3种菊酯(氯氟菊酯、氰戊菊酯和甲氰菊酯)进行对映体拆分,制备了每种菊酯的所有单体,并测定了单体的抗体活性。

根据菊酯群选性抗体交叉反应的结果,构建了2D-QSAR、HQSAR和topomer QSAR模型。

4. 氯氟氰菊酯单克隆抗体的制备及其酶联免疫检测方法的建立

设计了 2 种不同的半抗原，通过免疫和融合，制备了氯氟氰菊酯的特异性单克隆抗体。

优化 ELISA 的试验条件，建立了高灵敏地检测氯氟氰菊酯的酶联免疫法。

第二章 计算机辅助设计菊酯的群选性半抗原及其单克隆抗体的制备

2.1 引言

拟除虫菊酯类农药的分子量比较小 ($M_w < 1000$ Dal), 无免疫原性。所以必须和载体蛋白偶联后免疫动物, 才能引起免疫应答。但是拟除虫菊酯类农药本身没有和蛋白质反应的活性基团 (如羧基、氨基或羟基), 必须从头合成菊酯的结构类似物或者修饰菊酯分子中的某些基团 (如 α -氟基、双键), 才能得到相应的半抗原。对于大部分菊酯类农药来说, 半抗原的合成往往需要多步反应, 难度大。

为了有效地设计群选性半抗原, 引入了计算机软件技术 (如 Discovery Studio 2.5, Gaussian 04, hyperchem 8.0, Sybyl 1.1), 模拟半抗原的空间结构, 计算半抗原的原子电荷, 与目标物比较后, 选出与拟除虫菊酯空间结构和电荷分布最匹配的半抗原为免疫半抗原, 避免了试验的盲目性^[1-2]。根据预测的结果, 进行半抗原的合成和鉴定, 达到事半功倍的效果。

根据半抗原所带活性基团不同, 选择不同的方法合成抗原; 对于含有羧基的小分子, 通常可以采用碳二亚胺法 (EDC 法)、混合酸酐法和羧基二咪唑法 (CDI 法) 与载体蛋白偶联。对于含有氨基的小分子, 一般采用重氮化法和戊二醛法; 若氨基连在苯环上, 多倾向于选择重氮化法, 而对于烃链上的氨基往往选择戊二醛法, 不过并不绝对。对于含有羟基的小分子可以直接通过 CDI 法和载体蛋白偶联; 也可以用琥珀酸酐衍生后再按照分子中含有羧基的方法合成抗原。

和多克隆抗体相比, 单克隆抗体具有很多优势, 如特异性强、灵敏度高、易于工业化生产、重复性好。尽管单克隆抗体生产的周期长并且成本较高, 但在实际应用中仍然更受欢迎。

2.2 试剂与仪器

2.2.1 试验试剂

氯氰菊酯; 甲氰菊酯; 顺氰戊菊酯; 联苯菊酯; 溴氰菊酯; 顺式氯菊酯; 纯度均在 98% 以上, 购自天津市东方绿色技术发展公司。亚硝酸钠; N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS); 碳二亚胺 (EDC); 羧基二咪唑 (CDI); 完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂; 3-间苯氧苯甲酸 (PBA); 血蓝蛋白 (KLH); 牛血清白蛋白 (BSA); 鸡卵清蛋白 (OVA); 四甲基联苯胺 (TMB); 聚乙二醇 (PEG); 二甲基亚砜 (DMSO); N,N-二甲基甲酰胺 (DMF); 购自美国的 sigma 公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 Ig (HRP-IgG) 购自康成生物工程公司。RPMI-1640 培养基; 胎牛血清; L-谷氨酰胺; 次黄嘌呤-氨基嘌呤-胸腺嘧啶脱氧核苷 (HAT); 次黄嘌呤-胸腺嘧啶脱氧核苷 (HT) 均购自南京生兴生物工程公司。试验用水为 Millipore 系统制备的超纯水; 其他普通试剂均购自上海阿拉丁试剂公司, 所有试剂没有特别说明的均为分析纯。

2.2.2 试验动物

选择 6-8 周龄 BALB/c 雌性小鼠为实验动物，购自扬州大学比较医疗中心。

2.2.3 试验仪器

ACS-304 型电子天平（上海友声衡器有限公司）；AB104-N 分析电子天平（梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司）；Milli-Q Integral Cabinet 3 超纯水制备仪（美国的 Millipore 公司）；可调移液器（Eppendorf）；UV-1800 型紫外扫描仪（日本津岛）；MKs 型酶标仪（上海雷勃分析仪器厂）；双通道数控型注射乳化器（保定兰格自动化技术有限公司）；101A-2 电热鼓风干燥箱（上海实验仪器厂）；SP-250A 生化培养箱（南京实验仪器厂）；三星 BCD-233WNG 冰箱（苏州三星电器有限公司）；R686VLT-1386-3V 超低温冰箱（美国）；YDS-10 液氮罐（乐山市东亚机电工贸有限公司）；超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱仪（美国 Waters 公司）；AVANCE III 400MHz 全数字化核磁共振谱仪（德国 Bruker）；磁力搅拌器（上海沪西仪器公司）；PHS-3B 酸度计（上海仪器科学股份有限公司）；RE-52AA 旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂）；倒置显微镜（德国 Leica 公司）；Thermo 3111 型 CO₂ 培养箱（Thermo LabSystems 公司）；SW-CJ-IPO 超净工作台（苏州富泰洁净系统有限公司）；TDL-60B 台式低速离心机（上海安亭科学仪器厂）；HH-2 恒温水浴锅（江苏金坛荣华仪器厂）；XW-80A 旋涡混合器（上海精科实业有限公司）；八道可调移液器（美国热电公司）；DSC-W300 数码照相机（SONY 有限公司）；SHB-III 循环水真空泵（巩义市予华仪器有限公司）；KQ-250B 超声波清洗机（上海科导超声仪器厂）；LDZX-50KB 不锈钢立式灭菌器（上海天阜科技有限公司）

2.2.4 缓冲溶液

包被缓冲液（0.05M CB, pH 9.6）Na₂CO₃ 0.159 g, NaHCO₃ 0.293 g, 加水定容至 100 mL

封闭液（0.05M CB + 0.2%明胶）明胶 2.0 g, 包被液 1 L

洗涤液（0.01M PBS+ 0.05% Tween20）NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄·2H₂O 3.62 g, KH₂PO₄ 0.2 g, Tween20 0.05mL 加水定容至 1 L

抗体稀释液（0.01M PBS+0.1%明胶）NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄·2H₂O 3.62 g, KH₂PO₄ 0.2 g, 明胶 1.0 g, 加水定容至 1 L

显色液：底物缓冲溶液（A 液）：柠檬酸 1.54 g, NaH₂PO₄·12H₂O 6.66 g, H₂O₂ 0.03 mL 加水定容至 100 mL。

TMB 溶液（B 液）：TMB 600 mg 加乙二醇定容至 1 L, 超声溶解, 备用。使用前, A 液：B 液=5:1 比例混匀即可。显色液没有变蓝, 才可以使用。

终止液（2 M H₂SO₄）：量取 122 mL 的 98% H₂SO₄ 在冰浴和搅拌下, 缓缓地加入 888 mL 的超纯水, 冷却至室温, 备用。

2.2.5 培养基

RPMI 1640 培养基 直接购买

10% 1640 培养基 10%胎牛血清+ RPMI 1640 培养基

20% HAT 培养基 50 mL 胎牛血清+2.5 mL HAT+ 197.5 mL RPMI 1640 培养基

20% HT 培养基 100 mL 胎牛血清+5.0 mL HT+ 395 mL RPMI 1640 培养基

2.3 试验方法

2.3.1 半抗原的设计

根据 II 拟除虫菊酯结构的共同部分（包括间苯氧基甲基、 α -氰基和环丙烷基）设计了半抗原 1 的结构（见图 2-1a）。由于拟除虫菊酯是含有多个旋光异构体的混合物，参考相关文献^[79, 82, 120]，设计了其他 5 种半抗原（haptent2, haptent3, haptent4, haptent5, haptent6，简称为 H2, H3, H4, H5, H6）。结构如图 2-1(b,c,d,e,f)

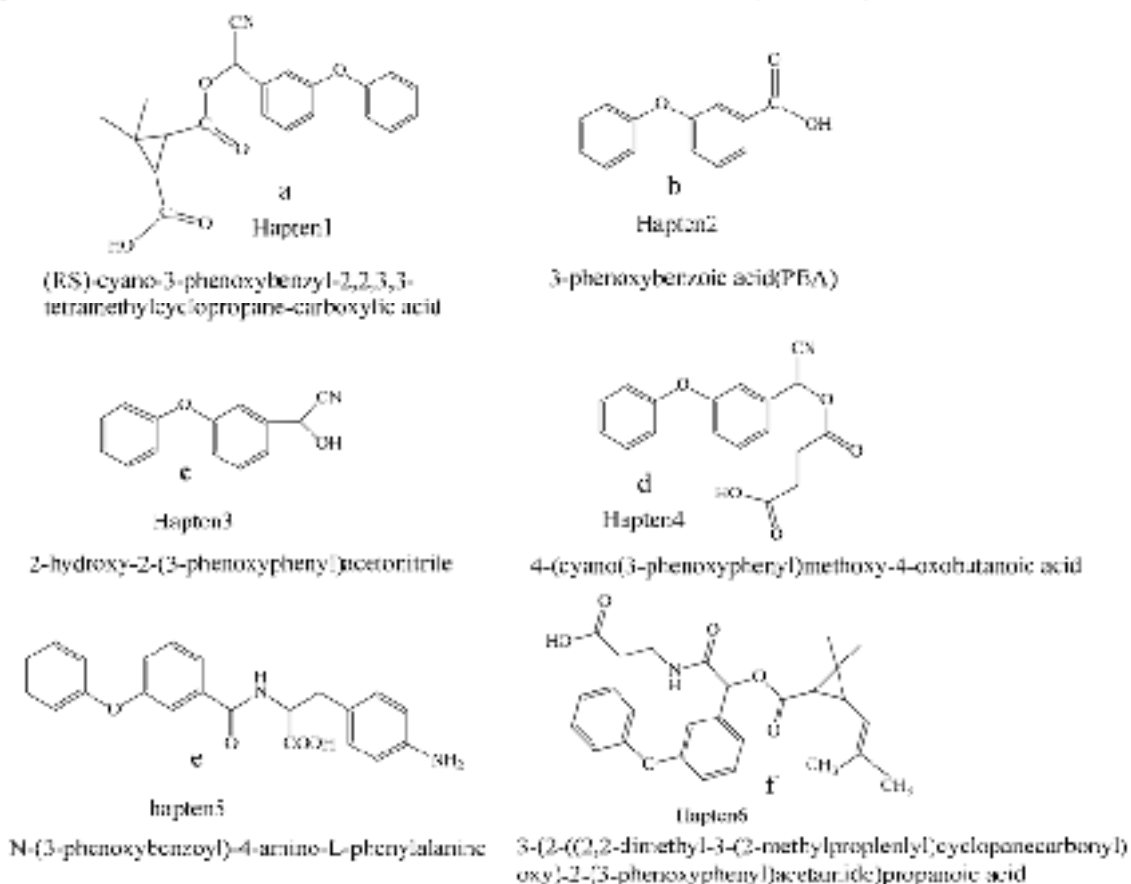


图 2-1 各种半抗原的结构

Fig. 2-1 Chemical structures of haptens

2.3.2 半抗原的模拟与计算

首先在 Discovery Studio 2.5 软件中构建 6 种半抗原和 6 种菊酯（氯氰菊酯、甲氰菊酯、顺氰戊菊酯、联苯菊酯、溴氰菊酯和顺式氯菊酯）的 3D 结构，具体操作如下：

第一步 构建分子的 3D 结构 打开 Discovery Studio 2.5，从 View 菜单下，打开 Toolbars，选择 Sketching；打开一个分子显示窗口 Molecule Window，File>new>Molecule Window；然后在此窗口构建化合物的 3D 结构，手性分子的构型可以由软件识别标记。

第二步 分子结构的能量优化 在 Tool 面板 Simulation 目录下，展开 Simulate

Structures, 应用 MMFF 力场进行能量最小化后, 得到优化后的结构。

第三步 计算分子电荷分布 在 Gaussian 04 软件中, 利用半经验量子力学法计算半抗原和目标物的原子电荷分布。

第四步 预测 比较半抗原和菊酯优化后的空间结构及分子的电荷分布, 选择空间结构相似度最高并且电荷分布相近的半抗原为免疫半抗原; 选择空间结构差异较大且电荷分布不同的半抗原为包被半抗原。

2.3.3 半抗原的合成

2.3.3.1 半抗原 1 的合成

半抗原 1 的合成方法是在 Mak 和 Lee 方法基础上改进而来的^[78, 120]。半抗原 1 的合成是以苯醚氰菊酯为原料, 通过高锰酸钾和高碘酸钠氧化后得到的。反应过程如图 2-2

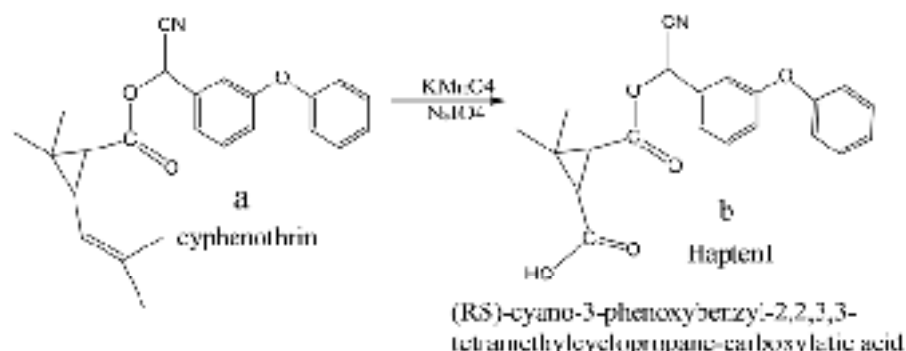


图 2-2 半抗原 1 的合成路线

Fig 2-2 Synthetic scheme of hapten 1

称取 1.20 g (3.2 mmol) 苯醚氰菊酯于 100 mL 的具塞三角瓶中, 再加入 7.0 mL 的叔丁醇和 17.0 mL 的水, 混匀。然后称取 3.48mg (0.22mmol) 的 NaIO_4 , 42.57mg (3.6mmol) KMnO_4 和 66.68mg (85mmol) Na_2CO_3 分别加入上述的三角瓶中。最后加入相转移催化剂甲基三辛基氯化铵, 常温下反应过夜。反应结束后, 用 6 mol/L 盐酸进行酸化, 用乙酸乙酯萃取三次, 合并有机相, 然后用硫化硫酸钠溶液洗涤有机相, 接着用无水硫酸镁干燥, 浓缩, 柱层析法纯化, 以石油醚和乙酸乙酯的梯度变化为洗脱剂 (从 10:1 增大到 6:4 左右)。以石油醚: 乙酸乙酯: 醋酸=69.9:30:0.1 为展开剂, 收集 $R_f=0.36$ 的组分, 浓缩, 得到淡黄色的油状物为 II 类拟除虫菊酯的半抗原, 终产物采用液质联用技术 (LC-MS) 和 ^1H 核磁图谱 (NMR) 进行鉴定。液质联用的实验条件, 色谱仪为 WATERS ACQUITYUPLC; 检测器为 WATERS ACQUITY PDA; 分析柱 BEH C_{18} 2.1×100 mm×1.7 μm ; 流动相 30% 甲醇 (含 0.1% 甲酸) 逐渐增大甲醇的比例到 100%; 柱温 45°C; 流速为 0.3 mL/min; 样品浓度为 1mg/mL, 上样量 1 μL 。

2.3.3.2 半抗原 2, 3 和 4 的合成

半抗原 2 为 3-间苯氧苯甲酸, 直接从百灵威公司购买的。半抗原 3 和半抗原 4 的合成路线参考 Hao 等人的方法合成的^[79]。

2.3.3.3 半抗原 5 的合成

半抗原 5 根据 G Shan 合成方法改进而来的^[121]。反应过程如图 2-3。

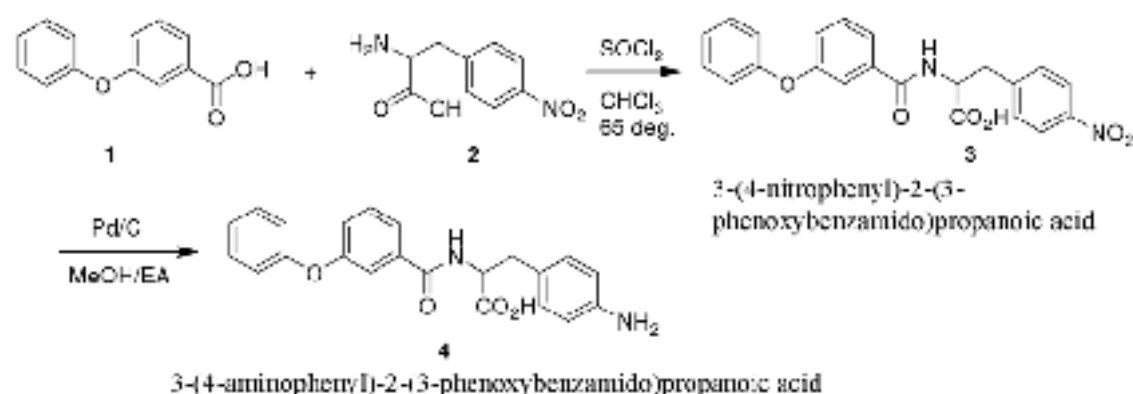


图 2-3 半抗原 5 的合成路线

Fig.2-3 Synthetic pathway of hapten 5

N-(3-苯氧基苯酰)-4-硝基-L-苯丙氨酸(英文名称, N-(3-phenoxybenzoyl)-4-nitro-L-phenylalanine, 化合物 3) 的合成 该反应在 N_2 保护下, 将 3-苯氧基苯甲酸(化合物 1, 500 mg, 2.3 mmol) 溶于冰浴中 $CHCl_3$ (10 mL), 然后向其中滴加 5 μ L 的 DMF 和 0.33 mL 氯化亚砷 ($SOCl_2$), 搅拌 5 min 后撤掉冰浴, 然后在 65 $^{\circ}C$ 油浴中加热 1 h, 旋转蒸发除去氯仿及多余的氯化亚砷, 得到无色透明的液体。加入 1 mL 四氢呋喃(THF) 溶解, 为 A 液; 接着将硝基苯丙氨酸(化合物 2, 480 mg, 2.3 mmol) 和碳酸钾 (K_2CO_3 , 380 mg, 2.8 mmol) 溶于 10 mL 水中, 然后在 10 min 内将 A 液缓慢滴加到强力搅拌下的 B 液中, 反应 1 h 后, 乙酸乙酯萃取两次 (50 mL \times 2), 0.8% NaCl 盐水洗两次 (30 mL \times 2), 无水硫酸钾干燥, 过滤旋干得到一黄色胶状物(化合物 3, 0.5 g), 直接用于下步, 该产物的结构通过液质联用技术(LC-MS) 得到证实。

N-(3-苯氧基苯酰)-4-氨基-L-苯丙氨酸(英文名称, N-(3-phenoxybenzoyl)-4-amino-L-phenylalanine, 化合物 4) 的合成 将 0.5 g 化合物 3 和 50 mg 钯碳(Pd/C) 加入到 10 mL 乙酸乙酯中, 在 25 $^{\circ}C$ 下氢化 2 h, 用薄层层析法(TLC 法) 监测反应进程, 点板显示, 原料完全反应时停止反应。过滤除去催化剂, 旋蒸得到一灰白色固体, 再加入 10 mL 乙酸乙酯溶解, 接着在超声波破碎仪中超声 10 min, 过滤得到湿品, 红外烘箱下干燥, 得到化合物 4 (165 mg), 反应得率 33%。

2.3.4 抗原的合成

2.3.4.1 免疫原的合成

根据计算机软件的模拟和计算, 选择半抗原 1 为免疫半抗原, 半抗原 1 采用活性酯法和 KLH 偶连^[1,22], 具体过程: 称取 50.0 mg (0.027 mmol) 的半抗原 1, 7.8 mg (0.04 mmol) 1-乙基-碳二亚胺盐酸盐(EDC), 0.66 mg (0.0054 mmol) 二甲基吡啶(DMAP) 和 4.1 mg (0.04 mmol) 三乙胺放入反应瓶 A 中, 加入 300 μ L N,N-二甲基甲酰胺(DMF) 溶解后, 得到 A 液; 然后在反应瓶 B 中加入 9.32 mg (0.081 mmol) N-羟基琥珀酸亚胺(NHS) 和 100 μ L N,N-二甲基甲酰胺(DMF), 溶解后得到 B 液。将 B 液逐滴滴加到 A 液中, 室温下反应 12 h, 得到 C 液。量取 KLH 45 mg (5.0 mg/mL, 9.0 mL) 并用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液稀释。在冰浴下, 将 C 液缓慢地加到蛋白质溶液中, 4 $^{\circ}C$ 下, 反应 6 h。

反应结束后, 将人工抗原混合液移入处理过透析袋中(处理过程: 用纯水煮 10 分

钟),用 0.01M pH 7.4 的的磷酸盐缓冲液 (PBS 溶液)透析 72 h, 6-8 h 更换一次透析液,期间更换透析液 6-9 次。最后将免疫原分装在 1.5mL 的离心管中,保存在-20°C,备用。

2.3.4.2 包被原的合成

1. 混合酸酐法 根据计算机软件分析,选择半抗原 2, 3, 4, 5 为包被半抗原。半抗原 2, 4, 5 采用混合酸酐法和 BSA, OVA 相连,通过改进文献中方法合成的^[75]。

半抗原的活化 称取半抗原 2, 4, 5 各 0.05 mmol,置于 10 mL 的小瓶中,每瓶中加入 1.0 mL 的 DMF,震荡,溶解,得到 A 液。在冰浴和搅拌下,再逐滴加入正丁胺 75 μ L;接着再缓慢加入 60 μ L 氯甲酸异丁酯,滴加完毕,在冰浴下反应 1 h。

偶联载体蛋白 称取 BSA (30 mg) 和 OVA (60 mg),用硼酸盐缓冲溶液 (BB, pH 8.8) 溶解后,在冰浴下,将活化的半抗原溶液等分,分别加到 2 种蛋白质溶液中,滴加完毕后,4°C 下反应 3 h。反应结束后,离心,取上清,得到 II 型拟除虫菊酯的抗原。

反应结束后,将人工抗原混合液移入处理过透析袋中,用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 缓冲溶液透析 3 d,更换透析液 8 次。最后将免疫原分装在 1.5 mL 的离心管中,保存在-20°C,备用。

2. 重氮化法 半抗原 5 采用重氮化法和 BSA (或 OVA) 偶联^[123],具体过程如下:

制备 A 液:称取 0.027 mmol 半抗原于 10.0 mL 小瓶中,逐滴加入 0.5 mL、1 mol/L 盐酸,溶液变浑浊,冷却至 0-5°C。然后逐滴加入现配好的 30% 亚硝酸钠溶液,用淀粉碘化钾试纸检测亚硝酸钠的用量,直到试纸在 15 秒内变蓝为止,0°C 下搅拌 45 min,得到 A 液。制备 B 液:称取 30 mg 的 BSA (或 50 mg OVA) 溶于 6.0 mL 的硼酸盐缓冲液 (0.2M BB, pH 8.8),得到 B 液。

在冰浴搅拌下,将 A 液缓慢地滴加到 B 液,并用 1 mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH,将 pH 保持在 8.5 左右,在冰浴搅拌下,反应 3 h,即得到人工抗原。

将反应好的包被抗原混合液移入透析袋中,用 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 缓冲液透析 3 d,期间更换透析液 6-8 次,即得到人工抗原。

2.3.4.3 完全抗原的紫外鉴定

1. 由活性酯法 (或者混合酸酐法) 合成抗原的鉴定

在合成抗原的过程中,若溶液澄清,蛋白浓度计算公式: $C=M/V$,其中, M 为牛血清白蛋白的质量, mg; V 为抗原透析后的体积, mL; C 为抗原的蛋白浓度。若抗原合成过程中产生了沉淀,则蛋白浓度用考马斯亮蓝染色法进行测定。首先用超纯水配制 1mg/mL 的 BSA (或 OVA) 标准溶液,然后再用纯水将浓度稀释为 0, 40, 60, 80, 100 μ g/mL。测定时,先在酶标板内加入 48 μ L 的 BSA (或 OVA) 溶液,接着加入 240 μ L 考马斯亮蓝染色液,立即混匀,每个浓度做 3 个平行,5 min 后在酶标仪的 595 nm 处测吸光值。以蛋白浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线。

按照相同的操作步骤,用稀释后的抗原代替标准蛋白浓度,测定抗原溶液在 595 nm 处吸光值,代入标准曲线的回归方程,计算抗原溶液的蛋白浓度。

摩尔吸光系数的计算 (ϵ): 配制半抗原浓度为 0, 10, 25, 50 μ g/mL 的 20% 乙醇水溶液,通过紫外扫描可知半抗原的最大吸收波长为 275 nm,在 275 nm 处测吸光值,每

个浓度做 3 个平行样，摩尔吸光系数计算公式： $\epsilon = \text{吸光值} / \text{摩尔浓度}$ 。

偶联比估算：用 20%乙醇溶液配制 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白溶液，以 20%乙醇水溶液为空白，对蛋白溶液进行 200-500 nm 波长扫描，测定载体蛋白和抗原在 275 nm 的吸光值为 A1、A2，偶联比 r 计算公式： $r = ((A2 - A1) / \epsilon) / (300 \times 10^{-3} / 66200)$

其中 ϵ 为摩尔吸光系数 (L/mol)，66200 为牛血清白蛋白的分子量， 300×10^{-3} 为牛血清蛋白浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

2. 由重氮化法合成抗原的鉴定

采用重氮化法合成抗原时，由于蛋白质和小分子之间形成了氮氮三键，故反应溶液会呈现黄色，用紫外分光光度仪扫描时，会在 340 nm 形成一个新的吸收峰。因此，抗原溶液的紫外扫描图若在 340 nm 处有新峰形成，说明偶联成功；否则说明偶联失败。

2.3.5 免疫程序

选择 6-8 周龄 DAID/c 雌性小鼠为实验动物，购买的小鼠先在动物房饲养一周，适应环境后，开始免疫。免疫原用 0.08% 无菌生理盐水稀释到 1 mg/mL (以蛋白含量计)，与等体积的弗氏佐剂混和，首次免疫用弗氏完全佐剂，以后的免疫则选用弗氏不完全佐剂。采用由连接管相连的 2 个注射器在双通道数控型注射乳化器上反复推 3-5 min，然后在 -20°C 放置 20 min，取出重新在乳化仪上反复推，该过程重复 5 次，乳化完成。免疫程序参考文献^[124]，具体方案见表 2-1

表 2-1 免疫程序
Table 2-1 Immunization program

免疫次数	免疫间隔时间 (d)	免疫剂量 ($\mu\text{g}/\text{只}$)	免疫方式	采血方式
1	28	100	背部皮下多点注射	
2	21	50	同上	
3	21	50	同上	尾部采血
4	21	50	同上	尾部采血
5	21	50	同上	尾部采血
6	21	25	腹腔注射	摘眼球采血

2.3.6 抗血清效价和抑制的测定

包板：用包被缓冲液 (0.05M 碳酸盐缓冲液, CB) 对包被原 (1 mg/mL) 从 1000 倍开始倍比稀释，然后按照 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加到 96 孔酶标板中， 37°C 反应 2 h。取出，洗板，每孔注入 210 μL 洗涤液 (PBST 溶液)，振荡 3 min，用力甩掉洗涤液，重复洗涤 4 次，在吸水纸上拍干。

封闭：按照 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入封闭液： 37°C 下温育 2 h，取出，洗涤 (过程同 1)。

加一抗：

测定血清效价时，将阳性血清从 1000 倍开始倍比稀释，从上往下，稀释倍数依次

增加，对应加入到酶标板的前 7 行，第 8 行加入阴性血清，50 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后，洗涤（过程同 1）、拍干。测定效价后，选出合适的包被浓度和抗体浓度。

测定血清抑制时，酶标板的第一列加入标准品稀释液 50 μL /孔，从第二列开始加入标准品溶液 50 μL /孔，标准品浓度从左往右依次增大，一般标准品稀释 10 个浓度。

加二抗 HRP 标记的羊抗兔 IgG 稀释 3000 倍，按照 100 μL /孔注入，37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min，洗涤（过程同 1），拍干。

显色 注入显色液 100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 20 min。

终止和测定 加入终止液 50 μL /孔，用酶标仪测定 450 nm 下的吸光值。说明每个试验做 5 次重复。

试验先选择了和半抗原 1 结构类似的 6 种菊酯测定抑制，其中氯氰菊酯的抑制效果最好，所以选择氯氰菊酯进行血清筛选。

2.3.7 杂交瘤细胞株的筛选

2.3.7.1 SP2/0 骨髓瘤细胞的复苏和培养

第一天，将液氮罐中的冻存管转移到-80 $^{\circ}\text{C}$ 的超低温冰箱中。第二天，事先灭菌超净台和预热水浴锅（37 $^{\circ}\text{C}$ ）。取出-80 $^{\circ}\text{C}$ 下的冻存管后，迅速转移到 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中进行融化，然后在超净工作台内，打开冻存管，将细胞液转移到 10 mL 的离心管中，再加入 5 mL 的 10% RPMI 1640 培养基，离心（800 rpm，6 min），弃去上清，轻轻加入 10% RPMI 1640 培养基，轻轻地摇动，再转到六孔板中，置于 5% CO_2 培养箱中培养。

在培养 SP2/0 瘤细胞的过程中，隔天换液，培养。融合前一天，对瘤细胞进行换液，将 SP2/0 瘤细胞状态调整到对数生长期。融合当天，弃去上清，然后加入 RPMI 1640 培养基，将细胞团从细胞板上吹下来，收集细胞，离心（1200 rpm，6 min）。弃去细胞上清，将细胞重悬于 10 mL 的 RPMI 1640 培养基，稀释 10 倍和 100 倍，用 0.4% 的台盼蓝染色计数，备用。

2.3.7.2 脾细胞的收集^[125]

融合前 3 天，采用腹腔注射进行冲免，冲免剂量减半且不含任何佐剂。融合当天，摘眼球取血，采用颈椎脱臼法将小鼠处死，立即放入 75% 酒精中消毒，浸泡 5 min 左右，采用无菌操作取出 BALB/c 小鼠的脾脏，用注射器的胶头适度用力地在筛网上研磨脾脏，脾细胞混出筛网得到悬液，收集，离心（1200 rpm，6 min），用 RPMI 1640 培养基洗涤脾细胞三次，最后一次离心后，用手指轻轻地弹散细胞，稀释 10 倍、100 倍和 1000 倍进行计数，备用。

2.3.7.3 细胞融合^[126]

首先用手指轻轻地弹散细胞，然后将脾细胞和 SP2/0 瘤细胞按照 5-10:1 比例进行混合，并补加 RPMI 1640 培养基至 20 mL，离心（1200 rpm，6 min），弃去上清，尽可能在棉球上吸净残留液，然后用手指将细胞轻轻地弹散，并将管底握于手心预热。融合的全过程约 7 min，第 1 min 内，将 1 mL 的 PEG 1500 由慢到快滴加到细胞中；第 2 min，用手握住管底，静置。第 3 min 和第 4 min，在 1 min 内滴加 1 mL 的 1640 培养基；第 5 min 和第 6 min，在 1 min 内滴加 2 mL 的 1640 培养基。第 7 min，在 1 min 内滴加 3-4

mL 的 1640 培养基。然后用 1640 培养基将体积增加到 15 mL。在 37°C, 5% CO₂ 培养箱中, 静置 5 min, 离心 (800 rpm, 6 min), 小心地弃去上清, 用手指 (或者在棉球上) 轻轻地弹散细胞, 然后用 HAT 培养基重悬细胞, 按照 200 μL/孔注入到 96 孔细胞板。最后, 在 37°C, 5% CO₂ 培养箱中, 培养。

2.3.7.4 杂交瘤细胞筛选^[127]

融合为第 1 天, 第 4 天进行 HAT 培养基半换液。第 6 天进行 HT 培养基全换液; 并且每天观察 96 孔细胞板中杂交瘤细胞的生长情况。第 7 天进行融合后细胞上清的第一次检测。在菊酯群选择性抗体的筛选过程中, 同时用五种标准品氯氰菊酯、甲氰菊酯、顺氰戊菊酯、溴氰菊酯和联苯菊酯筛选细胞上清。筛选细胞上清的方法仍然是 ic-ELISA, 通常先将细胞上清稀释 3 倍, 测定效价。然后再测每个阳性孔的抑制。因为空白值大小, 对抗体灵敏度的影响很大, 所以, 在测定细胞上清抑制时, 往往需要对细胞上清进行多个不同倍数的稀释。最后根据检测结果, 选择阳性强, 抑制好并且生长状态良好的细胞进行亚克隆。采用有限稀释法进行亚克隆, 先观察选出孔细胞的生长状态, 每孔取出 50 μL, 计数, 根据计数结果, 进行稀释, 按照 1 个细胞/孔吸取相应体积的细胞悬液, 用 HT 培养基稀释到 20 mL, 200 μL/孔进行铺板。

第一次亚克隆以后, 第 6 天就可以取细胞上清进行测定。按照和融合后细胞检测一样的方法, 筛选一周后细胞上清的效价和抑制。选出效价高和抑制好, 并且最好是单团的细胞孔 (原则是选择细胞团的个数越少的孔越好) 进行第二次亚克隆, 一般经过第三次亚克隆以后, 根据阳性率 98% 并且整块板的抑制效果相近, 然后将选出的细胞扩培到 24 孔板, 用 10% 1640 培养基进行培养, 等细胞长满底部后, 再次测定细胞上清的阳性和抑制, 最终选出的细胞扩培到六孔细胞板, 用 10% 1640 培养基进行培养, 隔天换液。

2.3.7.5 杂交瘤细胞的冻存

选出的杂交瘤细胞在六孔板中生长 5-6 天, 隔天换液, 细胞密度达到 5.0×10^5 个/mL, 可以冻存。每块六孔板可以冻存 2 管。需要注意的是, 在冻存管上, 标记好目标物种类, 细胞编号, 冻存日期。放入冻存盒中, 由于冻存盒中含有异丙醇溶剂, 延缓温度的下降速度, 因此, 直接将冻存盒从 4°C 转移到 -80°C, 24 h 后, 转入到液氮罐中长期保存。

2.3.8 单克隆抗体制备与纯化

2.3.8.1 体内诱生腹水法

选择健康的 BALB/c 小鼠, 按照 0.6 mL/只的量注射无菌石蜡油。石蜡油作为一种免疫抑制剂, 会减弱免疫反应。通常注射后 10 天, 再注射收集好的杂交瘤细胞, 收集的细胞需要用 RPMI 1640 培养基离心洗涤 3 次, 并将细胞浓度调到 2×10^6 /mL, 按照 0.5mL/只腹腔注射细胞。8 天后, 每天观察小鼠的状态, 如小鼠的腹部明显增大, 用手触摸有紧绷感, 并且不愿活动时, 可以收集腹水。然后通过离心 (6000 rpm, 12 min), 除去红细胞等杂质, 分装, -20°C 冻存。

2.3.8.2 抗体纯化

采用辛酸-硫酸铵法进行纯化, 具体过程见参考文献^[128]。

2.3.9 单克隆抗体的特性测定

2.3.9.1 亲和力的测定

根据参考文献^[29]，将包被原从 1 $\mu\text{g}/\text{nL}$ 开始倍比稀释四个不同的浓度进行包板，每个孔做三个平行。单克隆抗体从 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 开始倍比稀释 8 个浓度，采用 ic-ELISA 方法进行测定单克隆抗体 (mAb) 的效价。然后以 mAb 浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 的对数值为横坐标，以 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 为纵坐标在 origin 8.5 软件中绘制出 4 条曲线，根据绘制曲线计算出 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 抑制 50% 时对应的抗体浓度，换算抗体浓度的单位 mol/L ，然后两两一组，根据下式计算亲和常数 (K_a)

$$K_a = (n-1)/2(n[\text{Ab}']t - [\text{Ab}]t)$$

其中， n 为 2 个包被浓度的比值 (大于 1)； $[\text{Ab}]t$ 和 $[\text{Ab}]t$ 分别为对应 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 抑制一半时对应的抗体浓度 (mol/L)。

2.3.9.2 亚型鉴定

采用美国的 EnviroLogix 公司的单抗亚型鉴定的快速检测试纸条测定细胞上清，根据亚型鉴定的标准图谱，判断 mAb 重链和轻链的类型。

测定时，在 1.5 mL 的离心管中加入细胞上清约 0.5 mL，将鉴定重链的试纸条先放入，3-5 min 内显色，直接用肉眼观察结果。取出，再将鉴定轻链的试纸条放入，3-5 min 内显色，直接用肉眼观察结果。将检测试纸条结果和亚型鉴定的标准图谱对照，判断抗体亚型的种类。

2.4 结果与分析

2.4.1 半抗原和菊酯的空间模拟和理论计算

2.4.1.1 分子结构的能量最小化

在 Discovery Studio 2.5 软件中，利用 MMFF 力场优化后，得到各种物质的最低能量状态，结果如图 2-4。

由图 2-4 可见，不同半抗原的空间结构差异很大。主要表现在两个方面：一是两个苯环之间夹角变化，一个苯环处于一个平面，所以两个苯环代表不同的平面，半抗原 1 中两个苯环几乎处于同一个平面，而其他几个半抗原中两个苯环之间有一定旋转角度。二是环丙烷结构和 2 个苯环之间的空间位置变化，而拟除虫菊酯分子中两个苯环之间的夹角比较小，经比较，得出半抗原 1 的最低能量构型和菊酯分子最相似。

2.4.1.2 分子电荷分布的计算结果

利用 Gaussian 04 软件计算不同分子的原子电荷，结果如图 2-5

根据图 2-5，计算每种物质的总电荷，结果表明，所有菊酯分子的总带电量为负电荷，半抗原 1, 2, 3 分子总电荷为负，半抗原 4, 5, 6 分子的总电荷为正。结合 2.4.1.1 的结果，选择半抗原 1 为免疫半抗原，其余为包被半抗原。尽管半抗原 6 的空间结构和带电性质都和菊酯有差异，相比之下，半抗原 5 的差异更明显，所以选择了合成半抗原 5。此外，为了验证计算机软件的预测结果，还合成了半抗原 3 和半抗原 4。

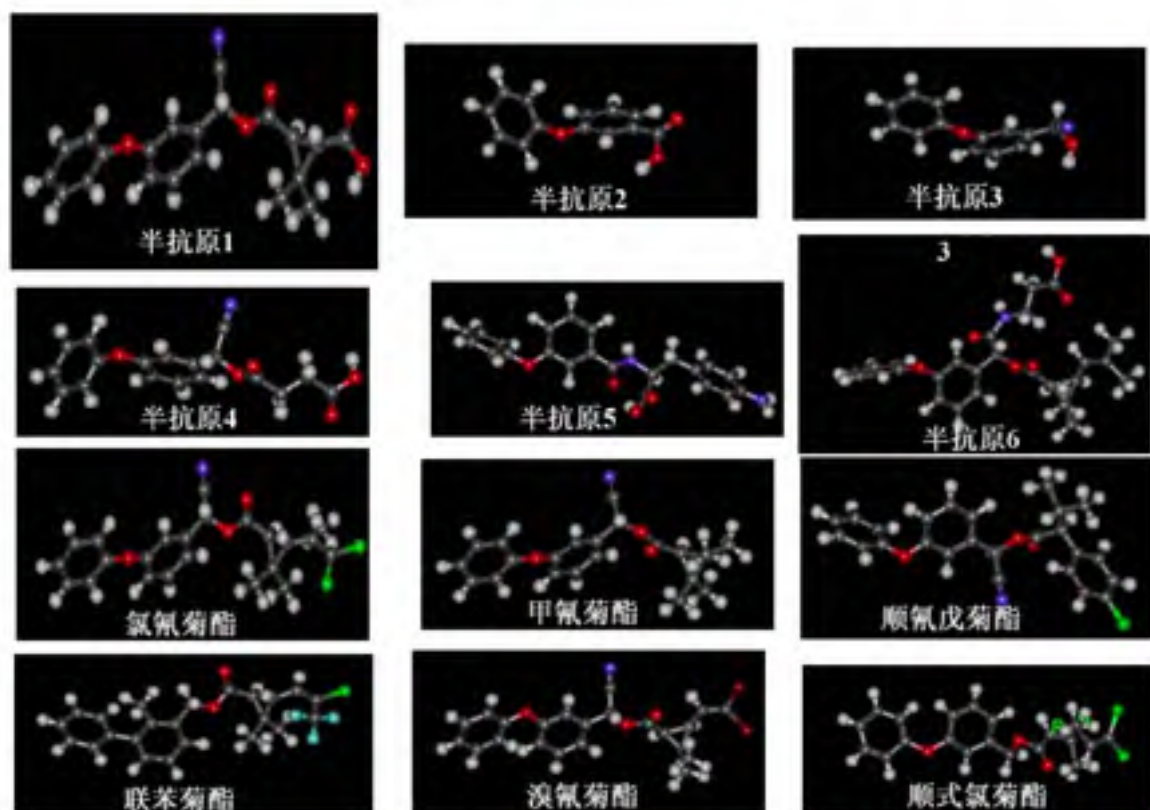
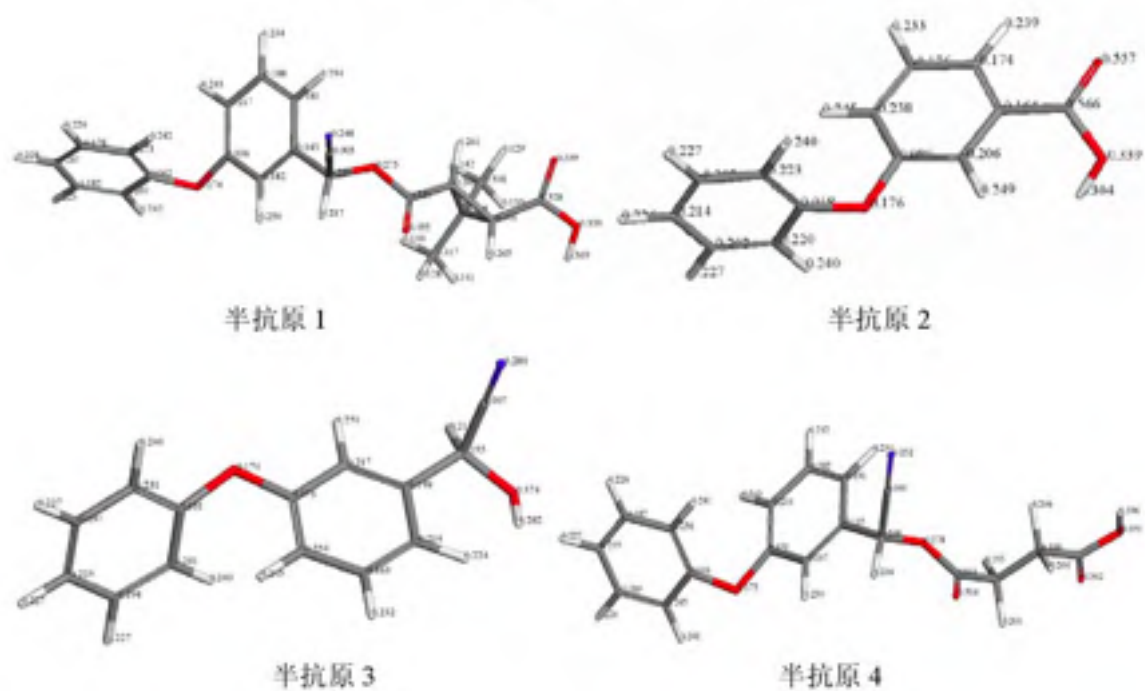


图 2-4 分子的最小能量构型

Fig.2-4 Minimum energy conformations of compounds



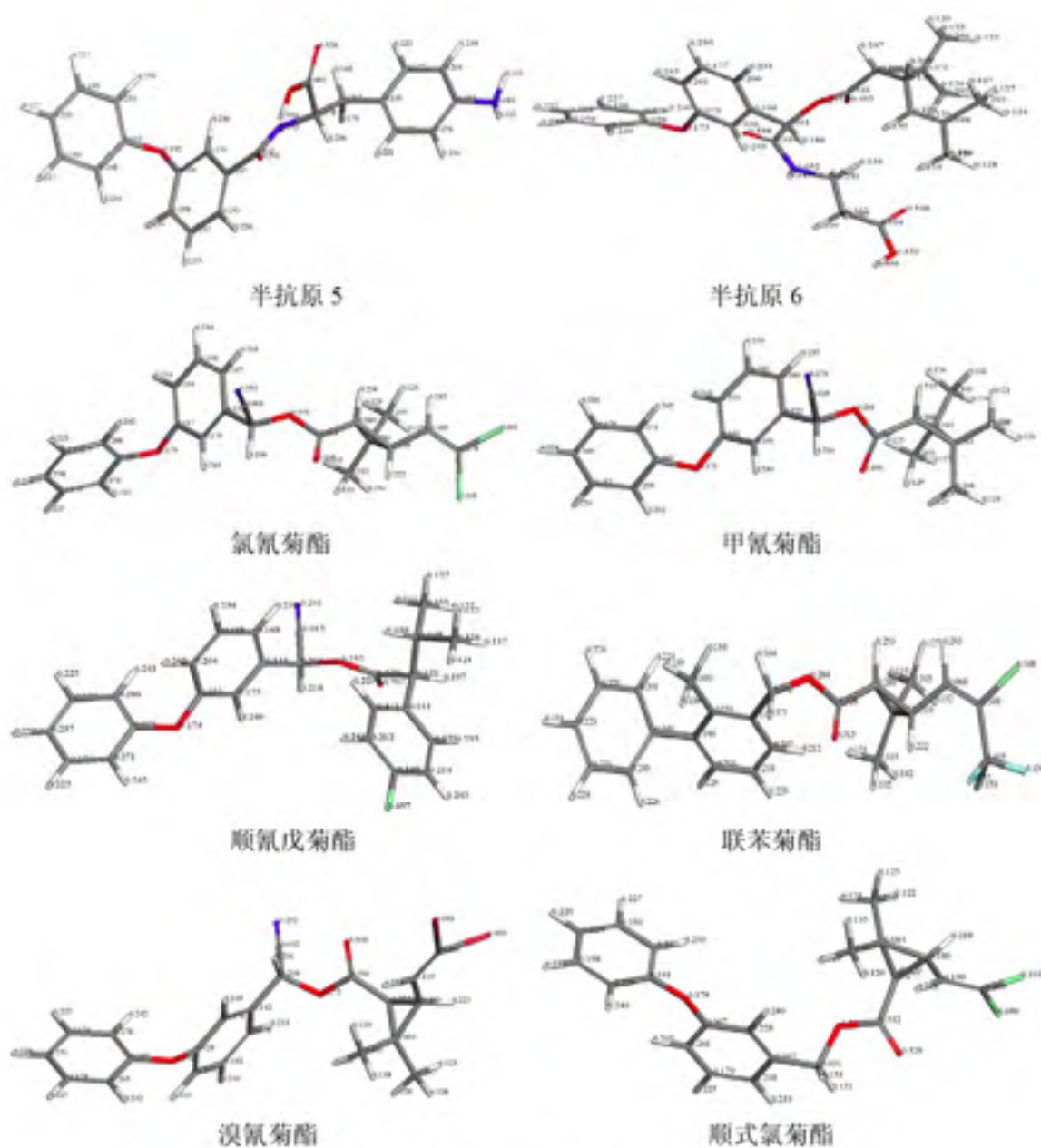
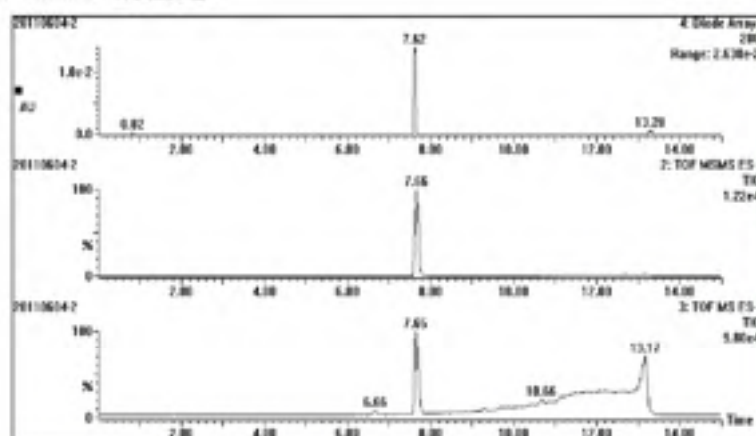


图 2-5 不同半抗原和菊酯的原子电荷分布图

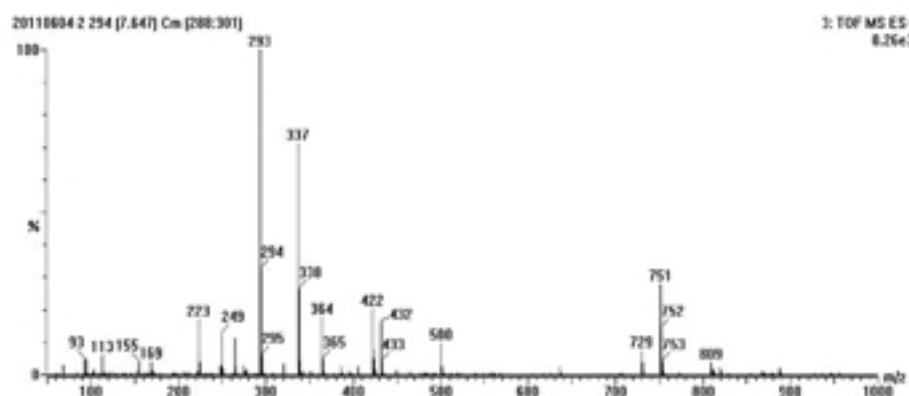
Fig.2-5 Charge distributions for all atoms in the structures of haptens and pyrethroids

2.4.2 半抗原的合成和鉴定

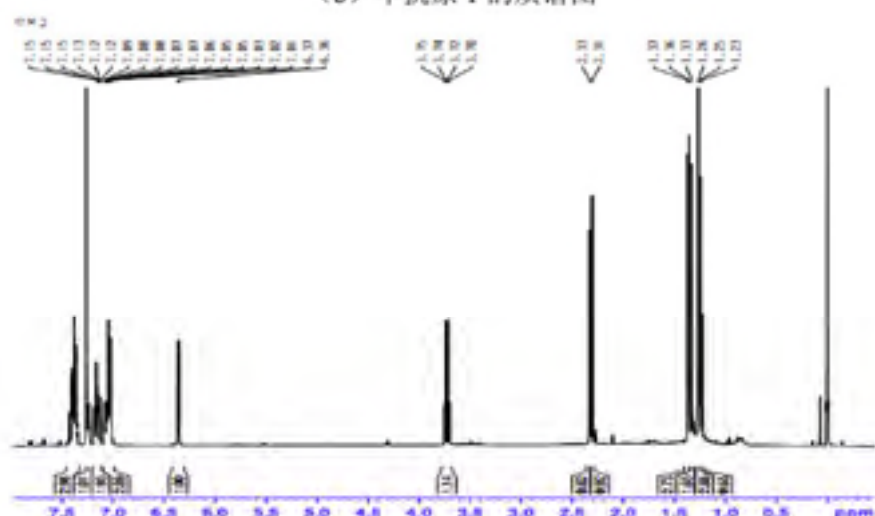
2.4.2.1 半抗原 1 (H1) 的鉴定



(a) 半抗原 1 的液相色谱图



(b) 半抗原 1 的质谱图



(c) 半抗原 1 的核磁图

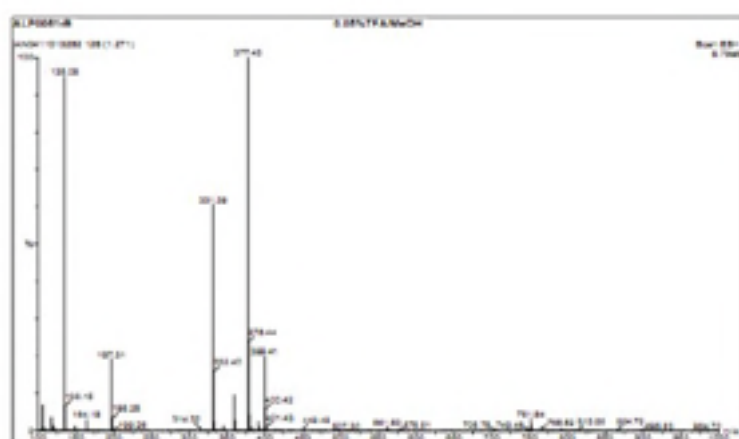
图 2-6 半抗原 1 的色谱图 (a)、质谱图 (b) 和核磁图 (c)

Fig. 2-6 LC spectrum(a), MS spectrum(b)and NMR spectrum(c) of haptene 1

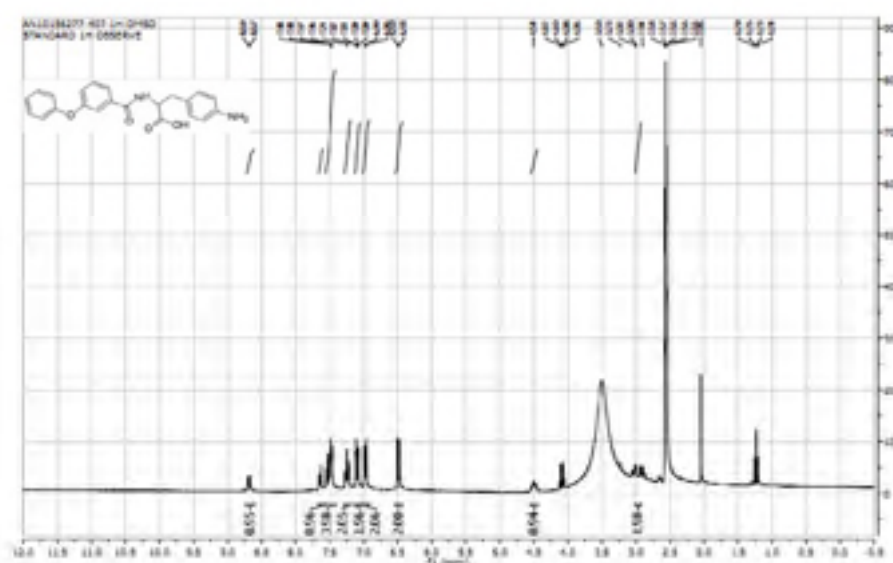
由图 2-6 (a) 色谱图中可以看出, 在 7.65 min 出现一明显的峰, 没有其他杂峰, 说明样品组分的纯度很高。由图 2-6 (b) 可以看出, 该峰对应的分子离子峰为 364, 采用的是负离子模式, 而半抗原 1 的分子量 365, 该分子失去 H⁺得到分子离子峰 364。由此推断该组分可能是半抗原 1。解析图 2-6 (c) 信息如下 H¹NMR(CDCl₃): δ 1.0-1.5 (6H, s, (CH₃)₂C), 2.0-2.5(2H, s, CO(CH)₂), 6.3-6.5(1H, s, CNCH), 7.5-7.0 (9H, s, ArH)。表明试验成功合成了半抗原 1。

2.4.2.2 半抗原 5 (H5) 的鉴定

由图 2-7 (a) 可见, 在 1.78 min 出现一个明显的峰, 说明样品中主要含有一种组分。结合图 2-7 (b) 可见, 该峰对应组分的分子离子峰为 407, 采用了阳离子模式, 对应组分的分子量在 406, 分子离子峰是分子结合一个 H⁺产生的, 说明试验成功地制备了化合物 3。



(b) 半抗原 5 的质谱图



(c) 半抗原 5 的核磁图

图 2-8 半抗原 5 的液相色谱图 (a)、质谱图 (b) 和核磁图 (c)

Fig.2-8 LC spectrum(a), MS spectrum(b) and NMR spectrum(c) of haptan 5

由图 2-8 (a) 可以看出, 0.28 min 对应的峰往往是溶剂峰, 在 1.19 min 出现一个明显峰, 表明样品中主要含有一种组分。由图 2-8 (b) 可见, 1.19 min 的峰对应的主要分子离子峰为 377, 在正离子模式下测定的, 所以该峰对应组分的分子量为 376。结合图 2-8 (c) 的分析结果如下: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.68 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NH), 7.59 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, ArH), 7.49~7.41 (m, 4H, ArH), 7.19 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, ArH), 7.04 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, ArH), 6.91 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH), 6.42 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, ArH), 4.45 (m, 1H, CH), 2.94 (m, 1H, CH_2), 2.86 (m, 1H, CH_2); 由此推断, 本试验成功制备了半抗原 5。

2.4.3 抗原的紫外鉴定

2.4.3.1 免疫原的鉴定

1. H1-KLH

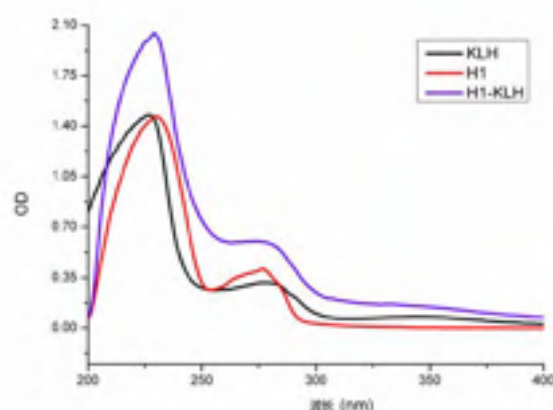


图 2-9 H1-KLH 的紫外扫描图

Fig. 2-9 Ultraviolet spectrum of immunogen H1-KLH

由图 2-9 可见，半抗原 1 (H1, Hapten1) 的吸收峰在 230 nm 和 275 nm，而 KLH 的吸收峰在 230 nm，280 nm 和 350 nm，偶联物的吸收峰向右偏移至 278 nm 并且吸光值明显增大，所以得出 H1 已经连接到 KLH 分子。

2.4.3.2 包被原的鉴定

1. H1-BSA 和 H1-OVA

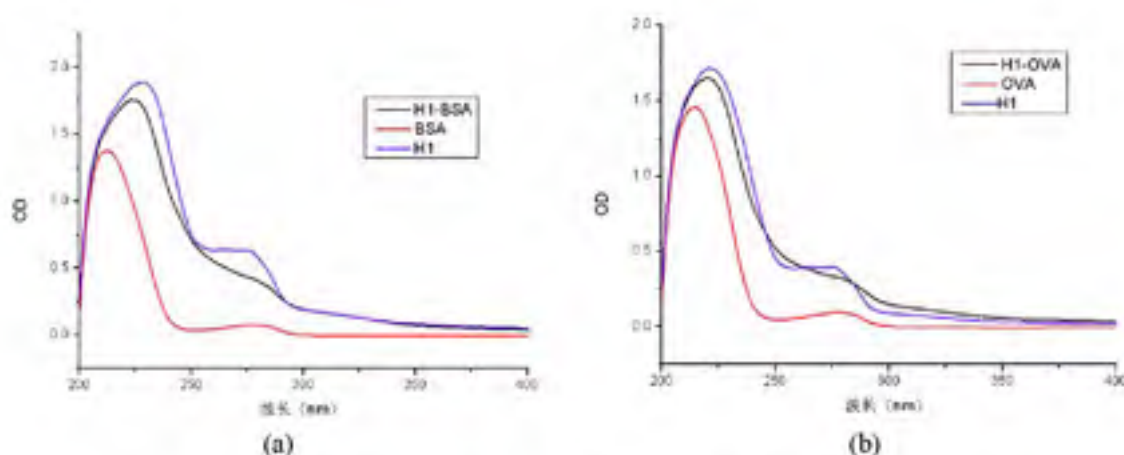


图 2-10 包被原 H1-BSA (a) 和 H1-OVA (b) 的紫外图

Fig.2-10 Ultraviolet spectrums of coating antigens H1-B (a) and H1-O (b)

由图 2-10 可见，半抗原 1 (H1) 的吸收峰在 230 nm 和 275 nm，而 BSA 和 OVA 的吸收峰在 220 nm 和 280 nm，偶联物的 220 nm 和 280 nm 吸收峰有明显的偏移和增大，所以得出小分子和蛋白质偶联成功。

2.H2-BSA 和 H2-OVA

由图 2-11 可见，半抗原 4 的吸收峰在 240 nm 和 290 nm 左右，而载体蛋白 BSA 和 OVA 的紫外吸收峰在 210 nm 和 280 nm，根据偶联物的紫外图在 230 nm 有明显偏移，并在 280 nm 紫外图谱向右偏移并吸收值增大，说明偶联成功。

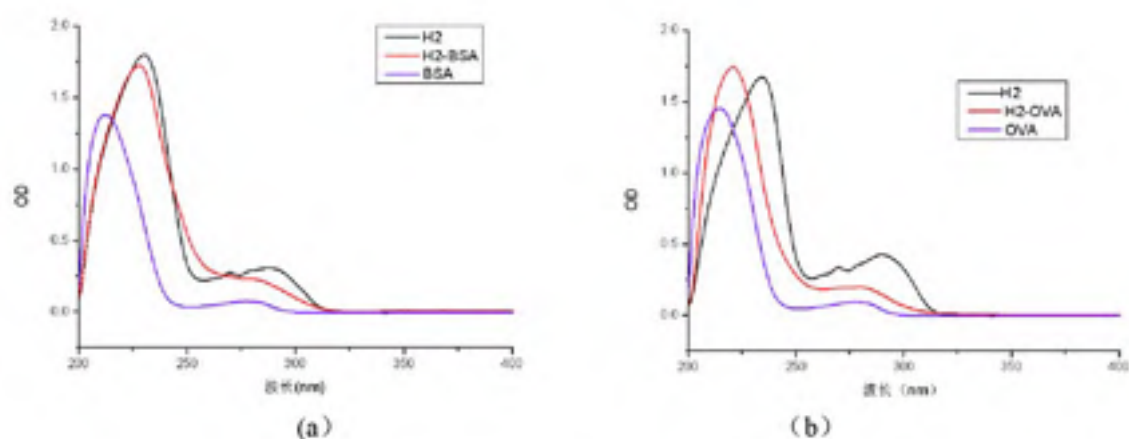


图 2-11 包被原 H2-BSA (a) 和 H2-OVA (b) 的紫外图
Fig.2-11 Ultraviolet spectrums of coating antigens H2-B and H2-O

2. H4-BSA 和 H4-OVA

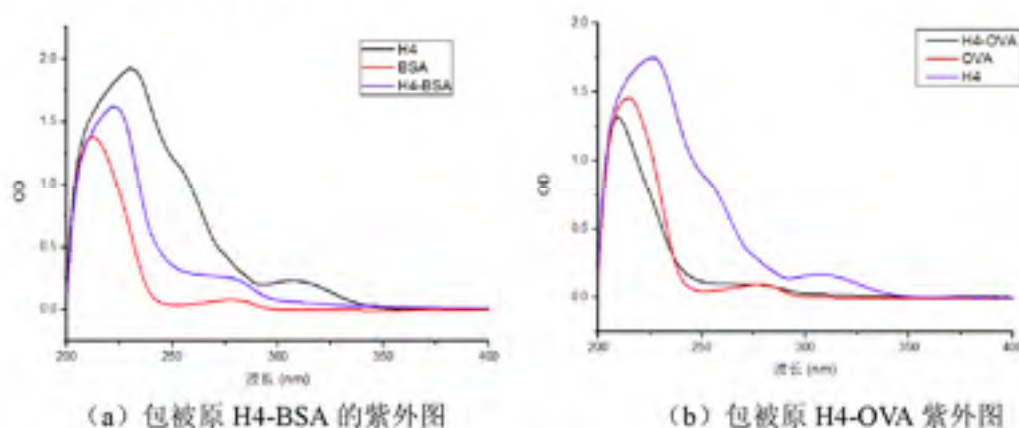


图 2-12 包被原 H4-BSA (a) 和 H4-OVA (b) 的紫外图
Fig.2-12 Ultraviolet spectrums of coating antigens H4-BSA (a) and H4-OVA (b)

由图 2-12 可见, 半抗原 4 的吸收峰在 240 nm 和 310 nm 左右, 而载体蛋白 BSA 和 OVA 的紫外吸收峰在 210 nm 和 280 nm, 根据偶联物在 225 nm 处的紫外偏移, 说明偶联成功。

3. H5-BSA 和 H5-OVA

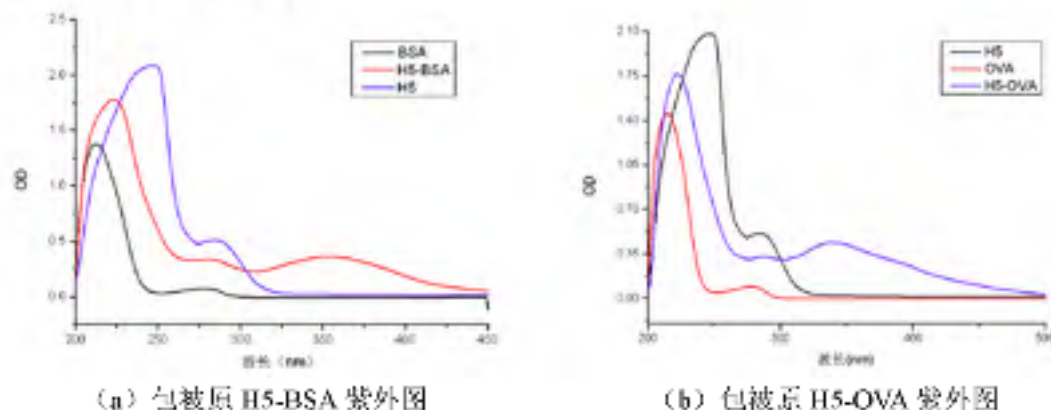


图 2-13 包被原 H5-BSA (a) 和 H5-OVA (b) 的紫外图
Fig.2-13 Ultraviolet spectrums of coating antigens H5-BSA (a) and H5-OVA (b)

由图 2-13 可见，半抗原 5 的吸收峰在 245 nm 和 285 nm 左右，而载体蛋白 BSA 和 OVA 的紫外吸收峰在 210 nm 和 280 nm，偶联物在 230 nm 和 280 nm 有明显的增高和波长偏移，结合重氮化法产生黄色产物在 340 nm 产生的新峰，说明偶联成功。

2.4.4 血清的筛选

表 2-2 不同血清的测定结果
Table 2-2 Results of different antisera

免疫原	血清编号	包被原							
		H1-OVA		H2-OVA		H4-BSA		H5-O	
		效价	IC ₅₀	效价	IC ₅₀	效价	IC ₅₀	效价	IC ₅₀
H1-KLH	11	++++	85	+++	30	+	55	+++	33
	12	+++	70	—	25	+	28	+++	19
	13	++++	366	+++	228	++	224	+++	226
	14	++++	68	+++	37	++	35	+++	31
	15	++	270	+	146	+	143	++	137
	16	++++	66	+++	27	++	25	++	23
H1-BSA	21	+++	113	—	35	+	37	++	44
	22	++	73	++	41	+	46	++	32
	23	+++	91	++	41	+	51	+++	37
	24	++	104	+	49	+	39	++	43
	25	+++	566	+	342	+	434	++	323
	26	++	181	+	155	+	142	+	154

说明：(++++) 代表吸光值大于 2.0；(+++) 代表吸光值在 1.5-2.0；(++) 代表吸光值在 1.0-1.5；(+) 代表吸光值在 <1.0；IC₅₀: ng/mL

由表 2-2 可得，同一免疫原，相同的免疫程序，但血清的效价和抑制差异很大。说明了动物个体差异对 ELISA 结果的影响比较大，所以建议每组小鼠不要少于 4 只。同时，由于 KLH 的分子量比 BSA 大很多，对免疫小鼠刺激比较大，产生抗体血清的效价普遍比较高，灵敏度也比较好。从表 2-2 还可以看出，12 号小鼠和 22 号小鼠的效价不是最高，但抑制效果比同组的其他小鼠好。鉴于 12 号小鼠的效价更高，有利于融合后细胞的筛选。所以，选择 12 号小鼠进行融合。

2.4.5 单克隆抗体的特性测定

2.4.5.1 亲和力的测定

抗体的亲和常数是对抗体识别抗原能力最直接的反应。一般认为， $10^7 < K_a < 10^{12}$ L/mol 之间为高亲和力抗体， $K_a < 10^7$ L/mol 为低亲和力。一般高亲和力抗体有利于检测方法建立。单克隆抗体亲和常数的测定结果如图 2-14

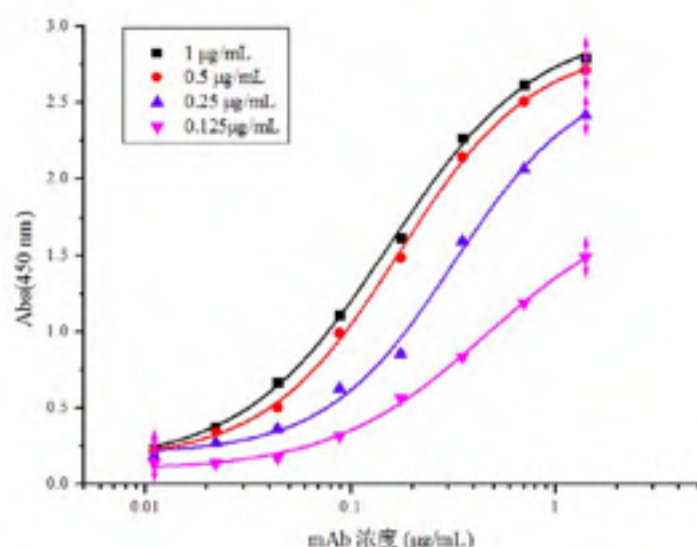


图 2-14 抗体 3E9 亲和常数的测定

Fig.2-14 Affinity constant result of antibody 3E9

根据图 2-14 回归方程, 计算出 ODmax 抑制一半对应的抗体浓度 0.014 µg/mL, 0.015 µg/mL, 0.022 µg/mL, 0.033 µg/mL, 先将抗体浓度的单位转化为 mol/L, 根据 2.3.9.1 公式计算得出, 本试验获得抗体的亲和常数为 3×10^8 L/mol。亲和力不是很高, 可能因为采用异源包被原的缘故。

2.4.5.2 mAb 亚型的鉴定

采用 IsoQuick™ 对鼠源性 mAb 的亚型的鉴定结果如图 2-15。

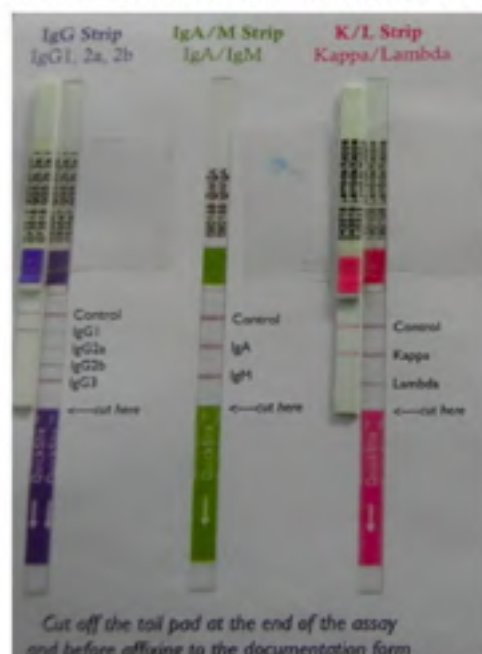


图 2-15 mAb 亚型的鉴定结果

Fig.2-15 Isotype identification result of mAb 3E9

由图 2-15 可见, 本试验获得 mAb 的重链为 IgG₁ 型, 轻链为 Kappa 链。

2.5 讨论

2.5.1 半抗原设计和纯度

按照传统设计半抗原的原则，应尽可能地包括目标物的所有结构部分，手臂的长度以 3-6 个碳原子为宜，而且连接臂一般不要含有苯环等容易引起免疫反应的结构，本文设计了 6 种半抗原，其中半抗原 1 包括了 II 型拟除虫菊酯的三部分结构间苯氧苯甲基、 α -氰基和环丙烷基。鉴于菊酯分子本身比较长，故没有再加手臂。半抗原 6 和半抗原 3、4 分别含有 II 型拟除虫菊酯共同结构的 2 部分，仅从结构上比较也可作为免疫半抗原，但是考虑到半抗原 4、6 的分子的电荷性质为正，而所有菊酯的电荷性质都为负，所以没有进行免疫。半抗原 2 仅含有菊酯分子中苯环部分，因为和菊酯分子的结构差异较大，认为比较适合做包被半抗原。

在制备半抗原 1 过程中，有机溶剂如果没有除彻底或和反应底物没有分开（苯酞氰菊酯菊酯是非极性的，疏水性很强），如纯度低于 80% 的半抗原合成免疫原时，当活化的半抗原 1 滴加到溶液中，特别容易产生浑浊，导致偶联反应的效率下降。这和半抗原 1 本身水溶性很差也有很大的关系。

2.5.2 抗原的偶联反应

众所周知，小分子和蛋白质的偶联比不能太高，也不能太低。偶联比太高，可能会掩盖了载体蛋白上的刺激动物发生免疫反应的位点，可能出现血清没有效价的情况。反之，如偶联比太低，有可能不能刺激动物产生针对小分子的免疫反应并产生相应的抗体。一般认为，小分子和蛋白质（如 BSA）的偶联比在 8-25 之间比较合适。但是小分子和蛋白质的偶联比只能估算，存在很大的误差。相比之下，反应比更好控制。小分子和 BSA 的反应比 1:70 比较合适；与 OVA 的反应比为 1:45 较合适，与 KLH 的反应比为 1:3000，免疫的效果比较好。不过也不绝对。不同的小分子目标物，物化性质差异很大，对偶联反应效率的影响也很大。

该法只能作为抗原偶联是否成功的一种辅助方法，最终根据免疫效果来判断，因此，抗体制备需要大量地重复试验，才可能得到好的抗体。

2.5.3 动物个体差异

试验表明，同样的免疫原和免疫程序，不同的小鼠个体，同一组小鼠血清的灵敏度能相差十倍、几十倍甚至上百倍，这种情况普遍存在。所以，建议每组小鼠的数量不少于 4 只。

2.6 本章小结

1. 设计了 6 种半抗原：II1, II2, II3, II4, II5, II6。借助计算机的 Discovery Studio 2.5 和 Gaussian 04 软件对半抗原和菊酯的能量最低构型、电荷分布进行了模拟和计算，通过比较，选择空间构型和菊酯最相似的并且电荷分布相似的 H1 为免疫半抗原，同时选择化学结构和空间构型差异大的并且电荷分布不同的 H4, H5 为包被半抗原。最后，

试验选择合成了 H1, H4 和 H5。

2.通过紫外法鉴定,成功地合成了免疫原 H1-KLH 和包被原 H1-B, H1-O, H2-B, H2-O, H4-B, H4-O, H5-B, H5-O。

3.选择免疫原 H1-KLH 免疫 12 号小鼠融合,五免检测时,抗血清对氯氟菊酯抑制达到了 19 ng/mL。

4.通过细胞融合和筛选,获得拟除虫菊酯的群选择性单克隆抗体 3E9。腹水纯化后,测定单克隆抗体 3E9 的亲合常数为 3×10^8 L/mol,说明是高亲和力抗体。采用细胞上清测得抗体的重链为 IgG₁ 型,轻链为 Kappa 链。

第三章 拟除虫菊酯多残留酶联免疫检测方法建立及其金标试纸条的制备

3.1 引言

和有机磷、有机氯农药相比，拟除虫菊酯杀虫剂对哺乳动物的毒性比较低^[130]，所以在刚开始使用拟除虫菊酯农药时，人们以为拟除虫菊酯杀虫剂不会污染环境。然而随着拟除虫菊酯农药在世界各地的广泛应用，拟除虫菊酯不仅污染了环境，而且还危害了人类健康。尽管仪器检测拟除虫菊酯的方法已经有 20 多年的历史，如 GC 法^[131-133]，但仪器检测法仍然不能克服本身固有的缺点，如不能进行现场检测、仪器价格昂贵和样品净化过程繁琐等。

对于果蔬和茶叶等食品中拟除虫菊酯残留的检测，更需要的是低成本和高通量的快速检测技术。在这种情况下，免疫分析法脱颖而出并得到了广泛的应用；尽管自 2006 年，国内就已经开始关于菊酯单残留的免疫分析研究^[65]。迄今为止，市场上关于菊酯免疫检测产品仍非常少见，因此，建立拟除虫菊酯多残留的免疫检测技术是非常必要的。

和酶联免疫试剂盒相比，胶体金免疫层析试纸条用于检测样品时，可以用肉眼直接观察结果，方便快捷，特别适合于现场检测^[134, 135]，因此，本文建立了拟除虫菊酯多残留酶联免疫检测方法并制备了相应的免疫层析试纸条。

3.2 试剂和仪器

3.2.1 试验试剂

各种菊酯标准品（氯氰菊酯；甲氰菊酯；顺氰戊菊酯；联苯菊酯；氰戊菊酯；溴氰菊酯；顺式氯菊酯；氟胺氰菊酯；氯氰菊酯；氯氯菊酯；苯醚氰菊酯；醚菊酯；高效氯氰菊酯；顺式氯氰菊酯；纯度均在 98% 以上，购自天津市东方绿色技术发展公司。羧基过氧化物酶标记的羊抗鼠 Ig（HRP-Ig G）购自康成生物工程公司。柠檬酸三钠；氯金酸 购自美国的 sigma 公司。碳酸钠；碳酸氢钠；氯化钠；磷酸氢二钠；磷酸二氢钠；磷酸二氢钾；柠檬酸；双氧水；四甲基联苯胺（TMB）；浓硫酸；以上试剂均购自阿拉丁试剂公司，如无特殊说明，均为分析纯。

3.2.2 试验仪器

ACS-304 型电子天平（上海友声衡器有限公司）；AB104-N 分析电子天平（梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司）；Milli-Q Integra1 Cabinet 3 超纯水制备仪（美国的 Millipore 公司）；可调式移液器（Eppendorf）UV-1800 型紫外扫描仪（日本津岛）；MKs 型酶标仪（上海雷勃分析仪器厂）双通道数控型注射乳化器（保定兰格自动化技术有限公司）；101A-2 电热鼓风干燥箱（上海实验仪器厂）；SP-250A 生化培养箱（南京实验仪器厂）；三星 BCD-233WNG 冰箱（苏州三星电器有限公司）；R686VLT-1386-3V 超低温冰箱（美国）；PHS-3B 酸度仪（上海理达仪器厂）；TDL-60B 台式低速离心机

(无锡市瑞江分析仪器有限公司); XW-80A 漩涡混合器(德国 IKA 有限公司); 八道可调移液器(美国热电公司); KQ-250B 超声波清洗机(上海科导超声仪器厂); 扫描电镜 H7000(日本 HITACHI 公司); 金标点样仪(Bio-dot: XYZ3000); 切条机 Bio-dot CM4000(美国的 Bio-dot 公司); 85-2 数显恒温磁力搅拌器(金坛市荣华仪器制造有限公司); 数码照相机(日本 Nikon 公司)

3.3 试验方法

3.3.1 ic-ELISA 方法的条件优化

ic-ELISA 方法的操作过程见 2.3.6, 根据低背景信号、高阳性值 (OD_{450nm}) 和低半数抑制浓度 (IC_{50}) 原则优化试验条件。因为抗体对氟氰菊酯的识别能力最好, 故选择氟氰菊酯为标准品进行优化。每个试验设置了 5 次重复。

试验采用棋盘法^[156]筛选 8 种包被原 (H1-B, H1-O, H2-B, H2-O, H4-B, H4-O, H5-B, H5-O) 和抗体的最佳组合, 确定包被原的种类, 包被原和抗体的最适浓度。

试验研究了抗体稀释液(0.01M PBS, pH 7.2)中 6 个不同氯化钠水平 0%, 0.5%, 0.8%, 1%, 2%, 4% (即不同离子强度) 对 ic-ELISA 方法的影响。

试验研究了抗体稀释液不同 pH 5.0, 6.0, 7.2, 8.0 对 ic-ELISA 方法的影响。

因为拟除虫菊酯类农药是一种非极性物质, 在水中的溶解度大概在几纳克到十几纳克^[11], 为了增加拟除虫菊酯在水中的溶解度, 研究辅溶剂对 ic-ELISA 方法的影响是非常重要的。本试验研究了四种有机溶剂(甲醇、乙醇、丙酮和 DMSO)在 6 个不同水平(0%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%)对 ic-ELISA 方法的影响。

3.3.2 灵敏度的测定

抗体的灵敏度通常采用半数抑制浓度 (IC_{50}) 来表示。采用 ic-ELISA 方法测定单克隆抗体对三种菊酯(氟氰菊酯、甲氰菊酯和顺氰戊菊酯)浓度在 0-1000 ng/mL 之间的抑制效果, ic-ELISA 方法的具体操作见 2.3.6。选择包被原 H5-O 浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 抗体的蛋白浓度为 0.06 $\mu\text{g/mL}$, 测定结果用 origin 8.5 软件进行四参数回归拟合, 根据拟合的回归方程, 计算抗体对氟氰菊酯、甲氰菊酯和顺氰戊菊酯的 IC_{50} 。

3.3.3 交叉反应

根据免疫学原理, 抗体往往能识别结构类似的一大类化合物, 因此, 利用纯化好的腹水测定结构相似的多菊酯类农药的 IC_{50} 值, 包括口氰菊酯、溴氰菊酯、顺氰戊菊酯和氰戊菊酯、氟胺氰菊酯、氟氰菊酯和氯氟氰菊酯、联苯菊酯和顺式氯菊酯, 并根据公式 $CR(\text{cross-reactivity, \%}) = (IC_{50 \text{ 靶标}} / IC_{50 \text{ 非靶标}}) \times 100$ 。计算 mAb 交叉反应性 (CR%, Cross Reaction)。

3.3.4 添加回收试验

因为拟除虫菊酯对于水生生物的毒性(如鱼)比较大^[157], 因此本试验选择水样来评估 ELISA 方法。本试验的水样取自无锡市的太湖, 经 GC-MS 证实不含有菊酯类农药

^[139]。试验选择了 3 种菊酯在三个不同水平的添加试验：氯氰菊酯 20 ng/mL, 40 ng/mL, 100 ng/mL；甲氰菊酯 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL；顺氰戊菊酯 250 ng/mL, 500 ng/mL, 1000 ng/mL。水样经过简单过滤和 20% 甲醇-PBS 稀释处理后，用于 ic-ELISA 进行测定。每个试验设置 5 个重复并连续进行 3 天测定。

3.3.5 检测拟除虫菊酯多残留金标试纸条的制备

3.3.5.1 金纳米粒子的制备

1. 容器准备

按照常规方法洗涤 150 mL 的三角瓶和转子，65°C 烘干后，再用新配置的王水（HCl:HNO₃=3:1, V/V）浸泡 48 h，先用自来水反复冲洗，彻底洗掉王水残留，用蒸馏水反复冲洗 5 次，最后用超纯水冲洗 3 次以上，65 °C 下烘干，备用。

2. 金纳米粒子的制备

金标试纸条上红色的产生是由大小合适的金纳米粒子（15-30 nm 之间^[138,140]）聚集在一起产生的，若金纳米粒子太小，产生的颜色变化不够明显；而若金纳米粒子太大，会因为位阻效应在试纸条上移动速度变慢，延长了测定时间^[141]。所以，本试验选择 25 nm 金纳米粒子进行金标试纸条的制备。

根据参考文献^[142]中方法合成金纳米粒子，所有试剂均用 Milipore-Q 超纯水配制。先向三角瓶内加入 45 mL 超纯水，在加热和剧烈搅拌下，加入氯金酸（1 g/L, 5.0 mL），等溶液沸腾 5 min 后，迅速加入新配置的 1% 柠檬酸三钠 0.7 mL，溶液的颜色将发生一系列的变化，由无色渐变为紫外，最终在 1 min 内变为暗红色，接着煮 10 min 左右，等溶液相对比较透明时，停止反应，室温冷却，4°C 保存备用。

3. 金纳米粒子的表征

紫外扫描：将制备好的金纳米粒子在 300-800 nm 之间进行扫描，根据紫外扫描图的最大吸收峰的波长，估算金纳米粒子的平均粒径。

透射电镜扫描(TEM)：观察金纳米粒子的均一性、分散性、形貌特征等。

3.3.3.2 金纳米粒子标记抗体的制备

1. pH 取 7 个 1.5 mL 的离心管，每管加入 1.0 mL 的胶体金溶液，分别加入 0.1 mol/L K₂CO₃ 溶液 1 μL, 1.5 μL, 2.0 μL, 2.5 μL, 3 μL, 3.5 μL, 4 μL，然后每管加入 10 μg 单克隆抗体，震荡混匀，静置 2 h。根据溶液的颜色变化进行判断，如金溶液的颜色变紫了，说明金纳米粒子在该条件下不稳定，可能发生了聚集。一般尽量选择 K₂CO₃ 量较高并且金溶液体系稳定，即 pH 比较高的体系。因为抗体和金纳米粒子之间依靠静电作用进行偶联^[143-145]，而体系碱性 pH 有利于抗体带上较多的负电荷，促进金纳米粒子和抗体的结合。但是盐离子浓度太大，导致金纳米粒子发生聚集。因此，研究了不同 pH 对体系稳定性的影响。

2. 金纳米粒子和抗体使用量的确定

根据公式 $C = A_{450} / \epsilon_{450}$ ，估算金纳米粒子的浓度^[146]，其中 c 代表了金纳米粒子浓度， A_{450} 是金纳米粒子在 450 nm 的吸光值； ϵ_{450} 代表纳米粒子粒径大小不同的常数。在制备金标试纸条的过程中，抗体的添加以稍过量为宜。本试验研究了 1 mL 的金纳米粒溶液

加入不同抗体量 (2.5 μg , 5 μg , 10 μg , 15 μg , 20 μg) 对体系稳定性的影响。根据溶液的颜色变化进行判断, 如金溶液的颜色没有变紫, 表明金纳米粒子仍处于分散状态。选择原则是体系稳定并且添加的抗体量最少。

3. 包被原浓度的确定

用包被稀释液将包被原 H5-B 的浓度调为 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 1.5 mg/mL, 分别喷到硝酸纤维素膜上, 烘干后备用。利用金标抗体溶液进行显色, 比较不同条件下的显色效果和试纸条的灵敏度, 选出合适的包被原浓度。

3.3.3.3 金标试纸条的制备与性能测定

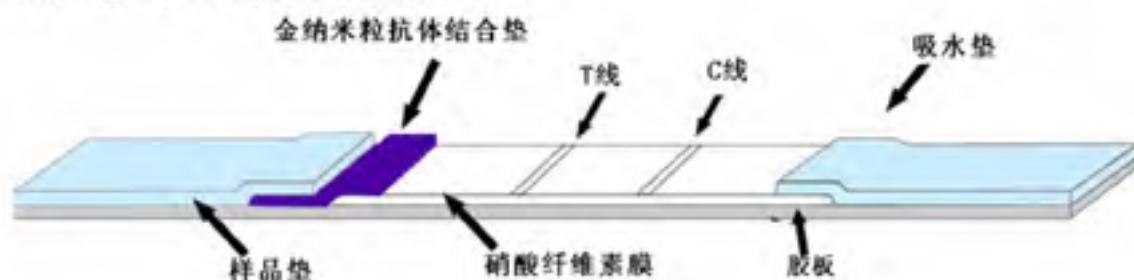


图 3-1 金标试纸条的示意图

Fig.3-1 Assembly diagram of gold-labeled strip

1. 金标记抗体: 量取 10 mL 的 25 nm 金纳米粒子溶液于试管中, 离心 (8000 rpm, 10 min), 目的除去金纳米粒子溶液中柠檬酸三钠, 用同样体积的超纯水重悬, 随后将拟除虫菊酯类群选择性抗体缓慢滴加入至金纳米粒溶液中, 室温震荡 2 h。

2. 封闭 滴加 10% BSA 水溶液 20 μL , 室温震荡 2 h, 封闭金纳米粒子上未与抗体结合的位点, 降低非特异性吸附。离心 (7000 rpm, 8 min), 除去多余的抗体和 BSA, 超纯水重悬, 重复洗 2 次, 最后将金标抗体浓缩 10 倍, 放 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

3. 组装前, 将已经标记有拟除虫菊酯类抗体的金纳米粒子加到结合垫上, 每张垫吸附 7-10 μL , 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱干燥 2 h, 备用。

4. 喷膜: 用喷膜仪将一定浓度的包被抗原和羊抗鼠分别喷到硝酸纤维素膜 (NC 膜) 的检测线 (T 线) 和控制线 (C 线) 上, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥 120 min, 备用。

5. 试纸条的制作: 将处理好的结合垫, 包被抗原和二抗的硝酸纤维素膜 (NC 膜), 样品垫、结合垫、吸水垫和胶板按照图 3-1 组装成试纸条。

6. 检测: 将试纸条的样品垫插入待测样品的溶液, 样品溶液通过层析作用从试纸条上流过, 7-10 min 后, 如图 3-2a, 若试纸条上出现一条红色线 (C 线), 表明测定样品为阳性样品, 其中菊酯浓度达到 (或超过了) 最大检测浓度。如图 3-2b 所示, 若试纸条上出现两条红色的线, 说明检测样品为阴性样品。若 C 线不显色, 说明试纸条失效。

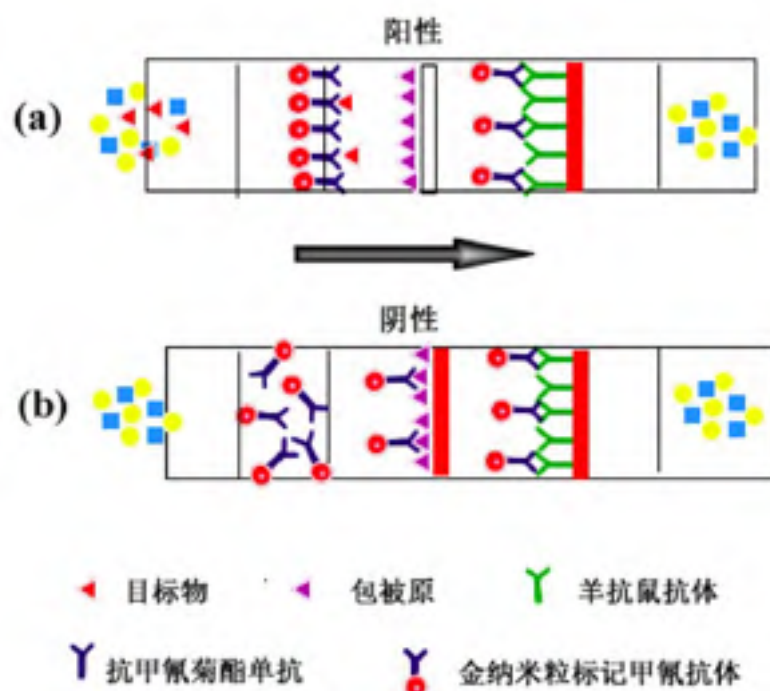


图 3-2 金标试纸条的结果判定图

Fig.3-2 Illustration image of gold-labeled strip

3.3.3.5 检测菊酯多残留金标试纸条的制备

1. 灵敏度测定

本试验采用试纸条测定了三种菊酯（氯氰菊酯、甲氧菊酯和顺氰戊菊酯）的 6-7 个水平，分别为氯氰菊酯 0 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL, 60 ng/mL, 80 ng/mL, 甲氧菊酯 0 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL, 600 ng/mL; 顺氰戊菊酯 0 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL, 600 ng/mL, 800 ng/mL。用移液器取出 200 μ L 标准品稀释液（或标准溶液）注入酶标板，然后将试纸条的样品垫分别插入上述溶液中进行测试。7-10 min 后观察结果。每个浓度作 5 个重复，将 T 线消失的最低标准品浓度定为试纸条对菊酯的肉眼检测限。对测定结果进行灰度扫描，以每个标准品浓度为横坐标，灰度值为纵坐标，绘制标准曲线。规定抑制浓度的 20% 为其检测限，计算氯氰菊酯的检测限，用于对菊酯类农药的半定量检测。

2. 交叉反应性

选择各种菊酯（联苯菊酯、氰戊菊酯、溴氰菊酯、氯氟氰菊酯、氟氯氰菊酯和苯醚氰菊酯，浓度为 5000 ng/mL）对制备好的金标试纸条进行交叉反应，每个试验做 5 次重复。

3.4 结果与分析

3.4.1 Ic-ELISA 方法的条件优化

3.4.1.1 包被原的筛选

由表 3-1 可见，同源包被原测定抗体的效价最高，说明同源包被原的亲合力最好。然而异源半抗原 2 和半抗原 5 合成包被原测定抗体的效价也比较高，而且，半抗原与

BSA 偶联物的效价普遍高于半抗原与 OVA 的偶联物，可能由于半抗原与 BSA 反应的偶联比较高造成的。但半抗原 4 合成的包被原和 mAb 的结合能力比较差，故效价比较低。因为半抗原 5-BSA 做包被原时，效价高且抑制效果最好，因此，选择 H5-BSA 作包被原。

此外通过棋盘法得到，包被原的浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ，单克隆抗体 3E9 的浓度为 0.06 $\mu\text{g/mL}$ ，在此条件下，测得氟氰菊酯的 IC_{50} 达到了 3 ng/mL 。

表 3-1 不同包被原对 ic-ELISA 方法的影响
Table 3-1 Effect of various coating antigens on the ic-ELISA

包被原 (0.5 $\mu\text{g/mL}$)	稀释倍数 (1 mg/mL)	A_{max}	A_{min}	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	R^2
Hapten1-BSA	1:64000	1.29	0.12	7.5	0.97
Hapten1-OVA	1:32000	1.55	0.28	8.3	0.91
Hapten2-BSA	1:32000	1.15	0.19	3.7	0.96
Hapten2-OVA	1:16000	1.20	0.14	6.6	0.96
Hapten4-BSA	1:4000	1.14	0.43	35.1	0.75
Hapten4-OVA	1:2000	0.50	-	-	-
Hapten5-BSA	1:32000	1.11	0.15	3.0	0.94
Hapten5-OVA	1:16000	1.38	0.30	5.4	0.99

3.4.1.2 缓冲液离子强度和 pH 对 ic-ELISA 方法的影响

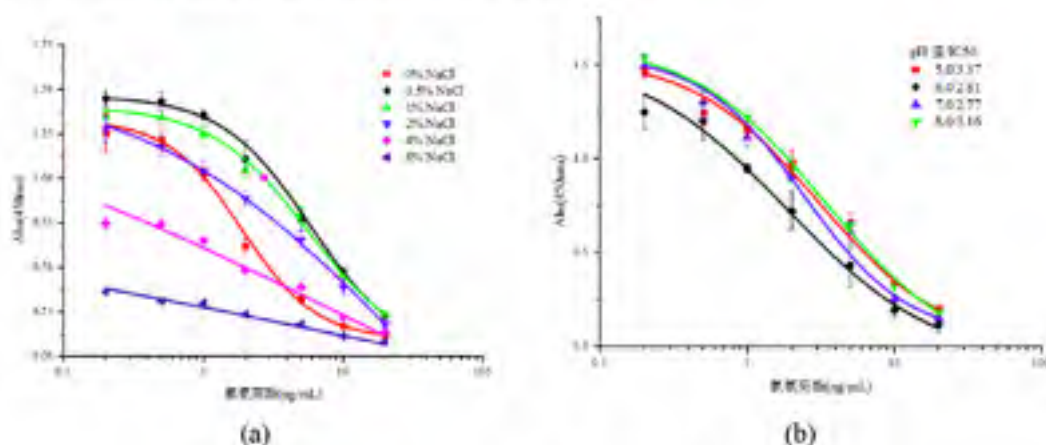


图 3-3 离子强度 (a) 和 pH (b) 对 ic-ELISA 方法的影响

Fig.3-3 The effects of ionic strength (a) and pH value (b) on assay performance

由图 3-3 (a) 可得，在低离子强度浓度下，随着离子强度的增大，曲线的最大吸光值 (A_{max}) 在逐渐增大， IC_{50} 值在不断变小。当缓冲液中 NaCl 含量增大到 1% 时， A_{max} 达到了最大值，此时，对应的 IC_{50} 最小，为 3.0 ng/mL 。随着 NaCl 含量的进一步增大， A_{max} 的值急剧下降，可能由于缓冲溶液中的高离子强度影响了抗体的和菊酯标准品的结合。因此，选择 1% NaCl 含量进行下一步优化。

由图 3-3 (b) 可见，当缓冲液的 pH 在 5.0-8.0 之间变化时， A_{max} 和 IC_{50} 没有明显的变化。试验选择了生理条件下的 pH 7.2 进行下一步的优化。

3.4.1.3 有机溶剂种类和浓度对 ic-ELISA 方法的影响

由表 3-2 可见, 不同水平乙醇和 DMSO 作助溶剂, 随着含量的增加, A_{max} (最大吸光值) 急剧下降; 而且 A_{min} (最小吸光值) 也比较大, 说明背景信号比较高。甲醇和丙酮作助溶剂时, A_{max} 和 A_{min} 变化不大, 而丙酮特别溶液挥发, 试验不容易重复。再加上当缓冲液中甲醇含量 20%-30%, A_{max} 处于最大值, 且甲醇含量 20% 时, IC_{50} 最小为 1.9 ng/mL, 因此, 选择 20% 甲醇为最适条件。

表 3-2 有机溶剂对 ic-ELISA 方法的影响
Table 3-2 The effects of organic solvent on ic-ELISA performance

种类	甲醇			乙醇			丙酮			DMSO		
水平	A_{max}	A_{min}	IC_{50}	A_{max}	A_{min}	IC_{50}	A_{max}	A_{min}	IC_{50}	A_{max}	A_{min}	IC_{50}
5%	1.0	0.076	3.95	1.11	0.102	4.04	1.18	0.091	2.90	0.92	0.102	3.12
10%	1.20	0.083	2.61	1.15	0.106	2.79	1.23	0.081	2.43	1.10	0.105	3.14
20%	1.31	0.082	1.90	0.93	0.112	2.56	1.28	0.083	2.20	0.99	0.095	3.2
30%	1.29	0.085	1.99	0.76	0.122	2.77	1.22	0.088	2.40	0.80	0.119	4.76
40%	1.07	0.098	2.24	0.59	0.105	1.26	1.13	0.112	2.67	0.65	0.124	6.63

3.4.2 灵敏度的测定

本文采用的 ic-ELISA 测定 mAb 3E9 对氯氰菊酯、甲氰菊酯和顺氰戊菊酯的抑制效果。以的 Log_{10} 菊酯浓度为横坐标, OD_{450nm} 的吸光值为纵坐标, 通过四参数回归方程拟合曲线, 结果如图 3-4。

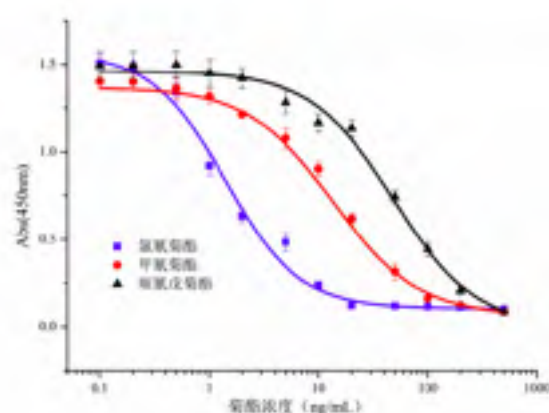


图 3-4 三种菊酯标品的抑制曲线
Fig. 3-4 The standard inhibition curve of three pyrethroids

根据图 3-4 中曲线拟和的回归方程, 计算可得: 氯氰菊酯 $IC_{50} 1.66 \pm 0.76$ ng/mL、甲氰菊酯 $IC_{50} 14.03 \pm 1.68$ ng/mL 和顺氰戊菊酯 $IC_{50} 45.76 \pm 4.07$ ng/mL。由此可见, 该抗体可以用于样品中菊酯多残留的检测。

3.4.3 交叉反应的结果

本试验将抗体与十几种菊酯、代谢物和各种半抗原进行交叉反应, 结果见表 3-3

由表 3-3 可见, 与抗体交叉反应比较大的菊酯有联苯菊酯、溴氰菊酯和氰戊菊酯。其中氰戊菊酯的结构和半抗原 1 的结构差异比较大。此外, 和半抗原结构差异大的氟胺

氟菊酯、氯菊酯等，交叉反应就很小。总的来说，该抗体能较灵敏地识别 6 种菊酯，即氟氰菊酯、甲氰菊酯、顺式氰戊菊酯、联苯菊酯和溴氰菊酯，灵敏度能够满足在蔬菜、水果和茶叶中最大残留限量的检测要求。在实际样品测定中，用氟氰菊酯标品浓度的对数值为横坐标，以 450nm 的吸光值为纵坐标绘制相应的标准曲线，其他菊酯含量通过交叉反应率进行校正。

表 3-3 交叉反应的结果
Table 3-3 Cross-reactivity results in ELISA

包被原 种类 菊酯名称	H1-BSA		H2-BSA		H5-BSA	
	IC ₅₀ (ng/mL)	CR (%)	IC ₅₀ (ng/mL)	CR (%)	IC ₅₀ (ng/mL)	CR (%)
氟氰菊酯	2.9±0.84	100	2.5±0.79	100	1.66±0.76	100
甲氰菊酯	19.8±1.63	15	22.1±1.72	11.3	14.0±1.68	11.9
半抗原 5	64.6±5.32	4.5	125.7±9.63	2.0	69.1±5.16	2.5
顺氰戊菊酯	74.5±5.68	3.9	34.2±3.57	7.3	45.8±4.07	3.7
半抗原 1	208.3±12.63	1.4	178±9.68	1.4	156.1±12.16	1.1
联苯菊酯	235.5±14.8	1.2	144.5±10.82	1.7	146.9±11.2	1.2
溴氰菊酯	272.2±15.76	1.1	161.4±12.5	1.6	199.6±10.75	0.9
氰戊菊酯	298.0±16.91	1.0	270.9±15.25	0.9	252.9±15.1	0.7
高效氟氰菊酯	698.2±32.5	<0.5	1266.8±107.63	<0.5	490.4±21.8	<0.5
氯氟氰菊酯	915.4±53.18	<0.5	1224.5±105.43	<0.5	1390.4±128.65	<0.5
顺式氟菊酯	1179.8±118.64	<0.5	540.8±35.27	0.5	1004.1±54.89	<0.5
半抗原 2	1302.7±142.7	<0.5	1044.8±96.75	<0.5	541.0±40.13	<0.5
半抗原 4	1518.2±132.87	<0.5	1131.6198.48	<0.5	1098195.32	<0.5
氟胺氰菊酯	1744.5±158.9	<0.5	1108.7±92.68	<0.5	1108.6±89.65	<0.5
半抗原 3	2235.6±198.54	<0.5	3774.1±254.87	<0.5	2054.4±186.77	<0.5
氟氯氰菊酯	3773.2±235.70	<0.5	1527.5±129.76	<0.5	5738.1±320.12	<0.5
苯醚氰菊酯	3318.0±207.61	<0.5	3307.3±214.19	<0.5	7005.5±487.35	<0.5

3.4.4 水样的添加回收

湖水中添加菊酯的回收率根据 Fig 3-4 标准曲线计算的，结果见表 3-4

由表 3-4 可得，二种菊酯在不同水平的平均回收率在 77.3%-111.3%之间，日内和日间的变异系数分别为 4.31-8.6%和 8.57-14.1%。

表 3-4 湖水中菊酯的添加回收试验

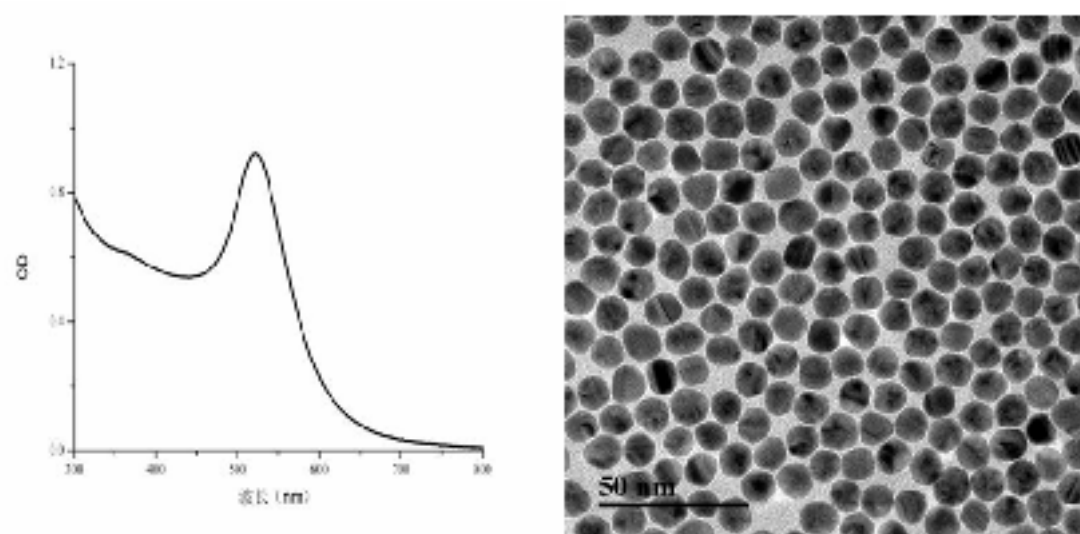
Table 3-4 Detection of pyrethroids in spiked lake water

菊酯名称	测定水平 ng/mL	平均回收率 (%)	变异系数 (CV,%)	
			日内 (n=5)	日间 (n=15)
氰氟菊酯	2	77.3	4.31	8.65
	4	89.7	5.46	10.09
	10	92.7	7.15	8.96
甲氰菊酯	5	92	7.18	12.44
	10	90.7	5.71	9.62
	20	89.3	4.05	14.10
顺式氰戊菊酯	25	111.3	5.49	10.03
	50	99.3	7.50	8.57
	100	90.7	8.60	10.47

3.5 金标试纸条的制备

3.5.1 金纳米粒子的表征

金纳米粒子溶液的外观呈现透明的酒红色。金纳米粒子溶液在 300-800 nm 之间的紫外扫描图和电镜扫描图见图 3-5



(a) Au 的紫外扫描图

(b) Au 的透射电镜图

图 3-5 Au 的紫外扫描图 (a) 和透射电镜图 (b)

Fig. 3-5 UV spectrum (a) and transmission electron microscope image (b) of Au solution

由图 3-5 (a) 可以看出, Au 溶液的最大紫外吸收峰在 523 nm, 峰宽比较窄, 说明 Au 的粒径分布比较均匀。结合 3-5 (b) 来看, 金纳米粒子的粒径在 24 nm-26 nm 之间波动, 分散性比较好。

3.5.2 抗体标记金纳米粒子条件的确定

通过肉眼观察溶液颜色的变化, 得出每毫升的金纳米溶液添加 0.1 mol/L K_2CO_3 溶

液约 3 μL 比较合适。

通过肉眼观察，得出每毫升的金纳米粒子溶液添加抗体的量在 5-10 μg 之间比较合适。

3.5.3 包被原浓度的确定

通过肉眼观察，随着包被原浓度逐渐增大，显色越来越深。因为包被原浓度过低时，试纸条显色太浅，不利于结果的判断。但包被原浓度过高，导致试纸条的灵敏度变差。因此，选择包被原浓度为 0.5 mg/mL。

3.5.4 金标试纸条对多种菊酯检测限的测定

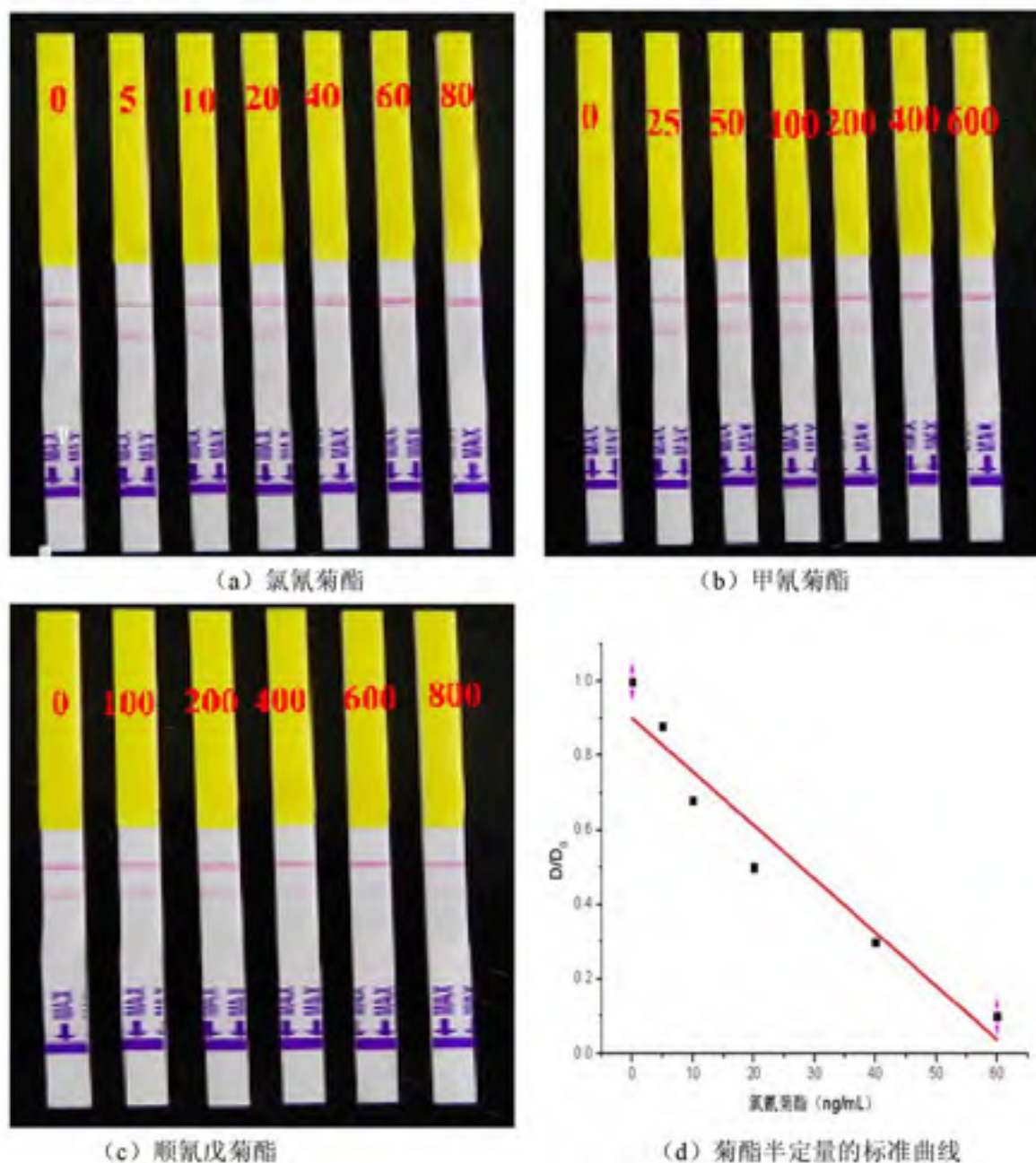


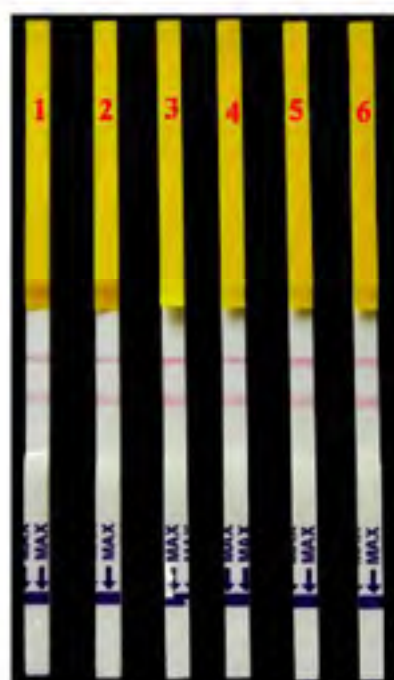
图 3-6 试纸条对不同菊酯半定量的测定结果

Fig.3-6 The results of semi-quantitative pyrethroids using test strips

由图 3-6 (a, b, c) 所示, 当氯氟菊酯、甲氧菊酯和顺式氯氟菊酯的标准品浓度分别达到 60 ng/mL、200 ng/mL 和 400 ng/mL 时, T 线完全消失。因此说, 胶体金免疫层析试纸条检测氯氟菊酯、甲氧菊酯和顺式氯氟菊酯的肉眼检测限分别达到了 60 ng/mL、200 ng/mL 和 400 ng/mL。

如图 3-6 (d) 所示, 试纸条检测氯氟菊酯浓度在 5-60 ng/mL 之间具有较好的线性关系, 回归方程为 $Y=0.9002-0.014X$, 相关系数 $R^2=0.93$, 根据回归方程计算, 可得抑制 20% 时对于氯氟菊酯的浓度为 12.86 ng/mL, 由此可得氯氟菊酯的仪器检测限为 12.86 ng/mL。若需要测定其他种类菊酯(甲氧菊酯和顺式氯氟菊酯), 根据交叉反应率进行相应的换算即可。由此可见, 本试验制备的试纸条可用于果蔬中菊酯多残留的粗筛。

3.5.5 交叉反应性



说明, 图中 1. 联苯菊酯; 2. 溴氰菊酯; 3. 氯氟菊酯; 4. 氯氟菊酯; 5. 苯醚菊酯; 6. 氟氯菊酯; 浓度均为 5 $\mu\text{g/mL}$ 。

图 3-7 金标试纸条的交叉反应结果

Fig.3-7 Cross-reactivity results of gold-labeled test strip

由图 3-7 可见: 金标试纸条测定联苯菊酯和溴氰菊酯的 T 线颜色稍微变浅, 这和 ELISA 交叉反应的结果相一致。金标试纸条和氯氟菊酯、氯氟菊酯、氟氯菊酯和苯醚菊酯均没有交叉反应, 说明金标试纸条主要识别三种菊酯氯氟菊酯、甲氧菊酯和顺式氯氟菊酯。

3.6 本章小结

1. 拟除虫菊酯多残留 ic-ELISA 检测方法的建立

Ic-ELISA 方法的最适条件: 包被原 H5-BSA 0.5 $\mu\text{g/mL}$; 单克隆抗体浓度为 0.06 $\mu\text{g/mL}$; 缓冲溶液中 NaCl 含量 1%, pH 7.2, 甲醇含量 20%。

2. 在优化条件下, 测定 6 种菊酯的 IC_{50} : 氯氰菊酯 1.66 ± 0.76 ng/mL、甲氰菊酯 14.03 ± 1.68 ng/mL、顺氰戊菊酯 45.76 ± 4.07 ng/mL、联苯菊酯 191.8 ± 11.2 ng/mL、溴氰菊酯 199.6 ± 10.75 ng/mL、氰戊菊酯 298.5 ± 15.08 ng/mL。三种菊酯(氯氰菊酯、甲氰菊酯和顺氰戊菊酯)在不同水平的平均回收率在 77.3%-111.3%之间, 变异系数小于 15%。

3. 金标试纸条的制备

确定金标记抗体的条件 0.1 mol/L K_2CO_3 3 μ L/mL 金纳米溶液; 抗体用量 $5-10$ μ g/mL 金纳米粒子溶液; 包被原 H5-B 浓度为 0.5 mg/mL。制备的试纸条对氯氰菊酯的仪器检测限达到了 12.86 ng/mL; 金标试纸条对氯氰菊酯、甲氰菊酯和顺氰戊菊酯的裸眼检测限分别达到了 60 ng/mL、 200 ng/mL 和 400 ng/mL, 灵敏度达到了果蔬中菊酯农药多残留的检测要求。

第四章 拟除虫菊酯的手性拆分和定量构效模型的建立

4.1 引言

拟除虫菊酯类农药含有 1-3 个手性中心，故存在多个对映异构体和非对映异构体。如氰戊菊酯含有 2 个手性中心，4 个旋光异构单体，2 对对映体（RR 型和 SS 型，RS 型和 SR 型），多对非对映体（如 RR 型和 RS 型，SS 型和 RS 型），而不同单体在杀虫活性、生物毒性和环境行为的选择性方面具有明显的差异^[47,148]。使用菊酯类农药单体作为杀虫剂，不仅可以大大地提高农药的杀虫活性，而且能够减少对目标生物的毒害和对环境的不利影响。因此认为，对菊酯对映体的拆分和检测具有重要的意义。

尽管菊酯手性拆分的研究已经有 20 多年的历史^[49,150]，然而，受色谱手性拆分技术的限制，目前只有少数菊酯能够实现单体形式商品化如顺氰戊菊酯。因此，本研究选择了单克隆抗体识别能力最好的三种菊酯农药（氰氟菊酯、甲氰菊酯和氰戊菊酯）进行了手性拆分。以后随着菊酯农药单体的商品化和不断应用，必将需要建立相应菊酯单体的检测方法。目前，关于菊酯单体的检测方法非常少，鉴于抗体具有识别不同立体异构单体的能力^[51-153]，因此，Cao Mengmeng 等^[52]人利用多克隆抗体建立了检测 S-生物丙烯菊酯的 ELISA 方法， IC_{50} 达到 89 ng/mL，检测限达到 2.5 ng/mL。

随着计算机软件应用领域的不断扩大，开始应用定量构效模型（如 Quantitative structure activity relationship model, QSAR 模型）探索抗原抗体的作用机理。所谓 QSAR 模型是一种以数学和统计学方法来研究有机小分子（如菊酯）与生物大分子（单克隆抗体）之间的相互作用，包括二维定量构效模型（Two-dimensional quantitative structure activity relationship 2D-QSAR），全息定量构效模型（Hologram quantitative structure activity relationship, HQSAR）和三维定量构效模型（Three-dimensional quantitative structure activity relationship, 3D-QSAR）。

2D-QSAR 指的是二维定量构效模型，其方法有 Hansch 方法、Free-wilson 方法、分子连接性方法等，其中应用最广泛的是 Hansch 方法，该方程通常以活性物质的半数有效量作为自变量，以分子的疏水性、电荷参数和立体参数作为因变量进行线性回归分析。2D-QSAR 的出现，对于药物化学领域产生了巨大的影响，使人们对构效关系的认识从定性水平上升到定量水平，并且也在一定程度上揭示了小分子与生物大分子结合的模式。

因为 2D-QSAR 不能细致地反应分子的三维结构与生物活性之间的关系。自 1980 年，人们开始探讨基于分子构象的三维定量构效关系的可行性。关于 3D-QSAR 模型提出了很多方法，如“距离几何学的 3D-QSAR”；“分子形状分析方法”；“比较分子场方法”（Comparative molecular field analysis, CoMFA）；“比较分子相似性方法”；“虚拟受体方法”等。其中 CoMFA 是使用最广泛的定量构效关系方法。

近年来，提出了全息定量构效模型（HQSAR 模型），所谓全息 QSAR 模型就是利用分子片段指纹图谱和偏最小二乘法（Partial least square method, PLS）生成基于片段的

构效关系,运用 PLS 法计算得到分子全息图中的定量变量,不需要经过分子叠合,预测一系列分子中观测活性的差异。分子全息图是分子 2D 结构指纹的延伸,涉及分子分岔和环状片段以及立体化学的关键信息。特点是快速,简便。研究表明,全息 QSAR 具有比复杂的 3D-QSAR 技术更好的预测能力。

4.2 试剂与仪器

4.2.1 试剂与材料

氯氟菊酯,甲氧菊酯和氰戊菊酯标准品,纯度 97%以上,购自衡水鼎尚商贸有限公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 Ig (HRP-Ig G) 购自康成生物工程公司;正己烷,异丙醇,甲醇,色谱纯,为美国 Fisher 公司产品;碳酸钠,碳酸氢钠,明胶,磷酸氢二钠,磷酸二氢钠,磷酸氢二钾, Tween20, 双氧水、四甲基联苯胺 (TMB); 以上试剂均购自阿拉丁试剂有限公司,均为分析纯;

Sino-Chiral OD 柱 (5 μm , 4.6 \times 250 mm, SN:0B03016-C); HP 硅胶柱(5 μm , 10.0 \times 250 mm, 115M1A807, SN:Y092304) 购自赛分科技有限公司

4.2.2 试验仪器

ACS-304 型电子天平 (上海第二天平仪器厂); AB104-N 分析电子天平 (梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司); Milli-Q Integral Cabinet 3 超纯水制备仪 (美国的 Millipore 公司); 可调式移液器 (Eppendorf); MKs 型酶标仪 (上海雷勃分析仪器厂); 101A-2 电热鼓风干燥箱 (上海实验仪器厂); SP-250A 生化培养箱 (南京实验仪器厂); 三星 BCD-233WNG 冰箱 (苏州三星电器有限公司); PH3-3B 酸度仪 (上海理达仪器厂); RE-52AA 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); TDL-60B 台式低速离心机 (无锡市瑞江分析仪器有限公司); HH-2 恒温水浴锅 (江苏金坛荣华仪器厂); XW-80A 旋涡混合器 (上海精科实业有限公司); 八道可调移液器 (美国 Thermo 公司); SHB-III 循环水真空泵 (巩义市予华仪器有限公司); KQ-250B 超声波清洗机 (上海科导超声仪器厂); Waters 484 液相色谱仪 (美国 Waters 公司)。

4.3 试验方法

4.3.1 氯氟菊酯、甲氧菊酯和氰戊菊酯单体的制备与鉴定

在上述 3 种菊酯中,氯氟菊酯有 4 对对映体,拆分的难度最大。所以下面以氯氟菊酯为例说明单体的制备过程。根据相关报道,利用一根手性柱很难实现氯氟菊酯 8 个单体的基线分离。所以,通过改进文献的方法^[94, 102, 154],通过 2 根柱子 2 次分离进行单体制备。第一步在 HP 硅胶柱上分成 4 对对映体。按照流出顺序定义为组分 I、组分 II、组分 III、组分 IV。第二步在 OD 半制备柱上 (Sino-Chiral OD 柱) 对每个组分过行再次拆分。同时优化了流动相的组分、流速、压力和柱温等条件。在制备菊酯单体的过程中,先少量上样,建立每种菊酯单体的拆分方法,然后再增大上样量,迫过硅胶柱和手性柱的 2 次分离,制备每种菊酯的单体。

化合物单体构型的鉴定方法主要有 2 种：一 购买标准品，将标准品和样品在相同的色谱条件下分析，根据出峰位置进行定性；二 通过文献比对，鉴定单体构型。本试验选择了第二种方法进行单体构型的鉴定。

4.3.2 菊酯群选性抗体对单体的抑制测定

单体标准品贮备液的配制：每个单体称取 5.0 mg 左右，加入 5.0 mL 的正己烷，震荡，充分溶解后，再用正己烷稀释 10 倍，浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，备用，因为单体不稳定，密封， -20°C 避光保存。

Ic-ELISA 标准品的配制：从 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 单体正己烷溶液中取 30 μL ，用氮气吹干后，用 0.6 mL 的甲醇溶解后，再加入 2.4 mL 的 0.01M PBS pH7.2 缓冲溶液，配制成 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单体标准溶液，该溶液现用现配。

采用 ic-ELISA 方法测定菊酯的群选性单抗对 14 个单体的抑制效果，具体操作见 2.3.6。

4.3.3 QSAR 模型的构建

本文利用 Discovery Studio 2.5 软件和 sybyl 1.2 软件构建了菊酯多残留检测抗体的 2D-QSAR、HQSAR 和 Topomer-QSAR 模型。

4.3.3.1 2D-QSAR 模型

建立 2D-QSAR 模型前，先构建所有化合物的 3D 结构，然后进行空间结构优化（能量最小化）。具体过程如下：

第一步 建立训练集(training set)和测试集(test set)。建立训练集时，将选在训练集内 12 种化合物的 3D 结构置于同一个 3D 窗口，并保存为 SD 格式。

第二步 增加自变量 LogIC_{50} (pIC_{50})。在 File 菜单下，打开 2D-training set sd 文件夹，这时在 Discovery Studio 2.5 Client 软件中打开一个 table 窗口，然后点右键，选择增加属性 (Add Attribute)，在弹出的对话框中，将名称命名为 LogIC_{50} ，确定。

第三步 计算化合物的理化参数 在 protocol 中展开 General purpose，选择 Calculate Molecular Properties，并进行相应的参数设置，运行 protocol。完成后，在 Job 中，点击“Calculate Molecular Properties”，打开计算结果。和之前的 table 文件相比，每个化合物后面增加了很多新的性质如疏水性 (ALogP，油水分离系数)，分子量 (Molecular Weight)，氢供体数 (Num-H-Donors)，氢受体数 (Num-H-Acceptors)，氢旋转键数 (Num-RotatableBonds)，环数 (Num-Rings)，苯环数 (Num-AromaticKings)，分子片段的极性表面积 (Molecular-Fractional Polar Surface Area)。

第四步 建立 Hansch 回归方程。采用多重线性回归法 (Multiple Linear Regression, MLR)。首先在 Protocol 目录的 2D-QSAR 文件夹下，双击 Calculate Multiple Linear Regression model。通常选择 LogIC_{50} 为自变量，以 ALogP，氢供体数，氢受体数，氢旋转键数，环数，苯环数为因变量，建立多重线性回归模型。运行 protocol，计算完成后，点击 job 下的 Calculate Multiple Linear Regression model 的 view result，即可。

4.3.3.2 全息 QSAR (HQSAR)

HQSAR 是 2D-QSAR 技术的延伸，用于研究分子片段对抗体活性的影响。先对分子中所有可能的片段和子片段要素运用不同颜色进行编码，能够直观地反映识别哪些片段对抗体活性的贡献是正面的，哪些是负面的。在 Sybyl 1.2 软件中构建 HQSAR 模型时，需要两步

第一步：分子全信息指纹图谱的计算，包括 3 个参数：分子不同片段的长度、不同片段的大小和不同片段之间的差异。利用分子的指纹图谱建立表示 Sybyl-X 1.2 分子全信息包。

第二步：构建 HQSAR 模型。对 Sybyl-X 1.2 软件中分子全信息指纹图谱进行偏最小二乘分析，导入 Sybyl 数据库，选择 pIC_{50} （抗体半数抑制浓度的负对数值）作为自变量，分子其他指纹图谱作为因变量，构建 HQSAR 模型。其中，不同分子片段对抗体活性（半数抑制浓度， IC_{50} ）的贡献通过不同颜色进行编码。所以，首先用不同颜色编码分子的原子种类（atoms, A）、化学键（bonds, B）、分子连接（connections, C）、氢原子（hydrogen atoms, H）、供体和受体（donor & acceptor, DA）。在尝试了分子指纹图谱的多组组合后，最终确定了片段大小在 4-10 之间。建立了基于 B/C/Ch 的 HQSAR 模型。根据优化后不同片段颜色差异，分析分子指纹图谱和抗体活性变化之间的相关性。

4.3.3.3 Topomer-QSAR 模型

Topomer-QSAR 模型是将分子域比较法 (CoMFA) 和虚拟筛选技术 (topomer search) 相结合建立的一种 3D-QSAR 模型，用于预测化合物的生物活性。和传统的 CoMFA 相比，不需要手动分子叠合，具有快速、高效和自动回归的优点。本试验在 Sybyl 1.2 软件中构建 Topomer-QSAR 模型的具体步骤如下：

第一步：对所有分子的结构在 MMFF 力场中进行能量优化。

第二步：计算所有分子的表面特性，包括空间场和静电场的等高势。不同结构表面空间场和静电场等高势对抗体活性的贡献，运用不同颜色进行编码。试验计算的是溶液状态下的分子参数，探针半径为 1.4 Å。

第三步：运用偏最小二乘法进行回归分析，建立相应的模型。

4.4 结果与分析

4.4.1 氯氰菊酯、氰戊菊酯和甲氰菊酯单体的制备和鉴定

4.4.1.1 氯氰菊酯单体的制备和鉴定

1. 经过优化各种参数，得出氯氰菊酯在硅胶柱上的分析色谱条件

流动相：正己烷：氯仿：乙醚=200:1:6

流速：4.7 mL/min

紫外检测器波长：280 nm

柱温：26 °C

样品浓度：10.77 mg/ml。 样品溶液的配制：称取样品 100.77 mg，加 10 ml 流动相，经 0.45 μ m 滤膜过滤后即得。

上样量：50 μ L

压力: 570 psi (Pounds per square inch, psi, 磅/平方英寸)

在此条件下, 实现了氯氰菊酯的 4 对对映体 (I, II, III, IV) 的完全分离, 结果如图 4-1。

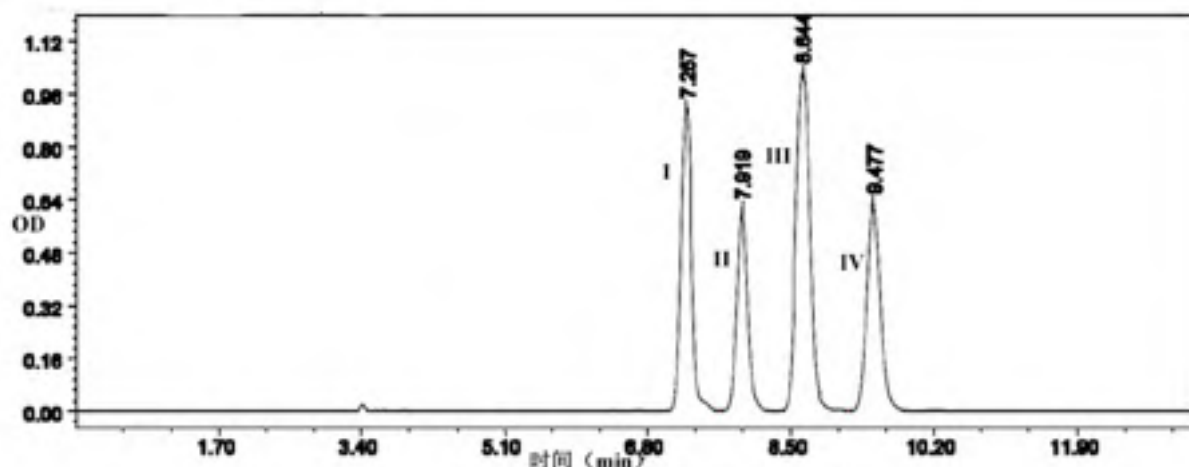


图 4-1 氯氰菊酯对映体在高效硅胶柱上的分离结果

Fig.4-1 Separation of the diastereomers of cypermethrin by a HP-Silica column

第二步对氯氰菊酯的每个组分 (每对对映体) 在 Sino-Chiral OD 手性色谱柱进行再次拆分, 优化后的色谱条件为:

流动相: 正己烷: 异丙醇=99.7:0.3

流速为 0.5 mL/min

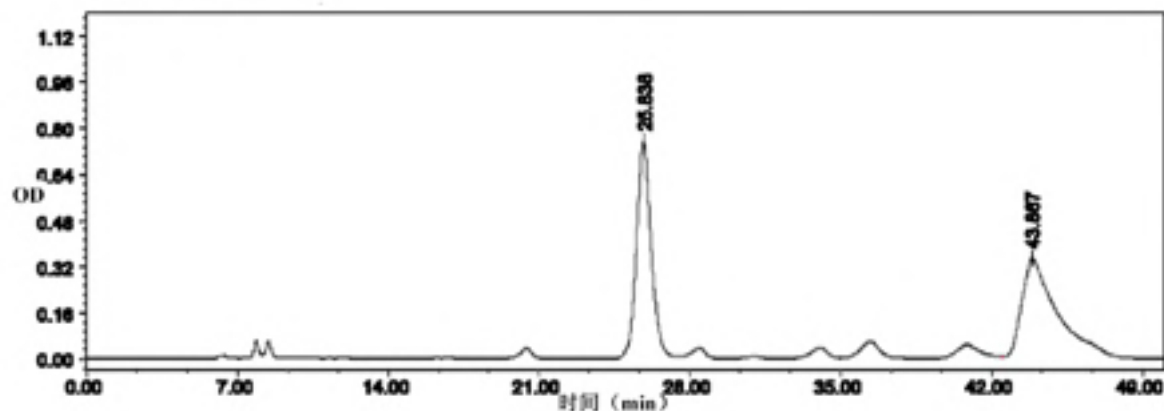
紫外检测器的波长: 280 nm

柱温: 26 °C

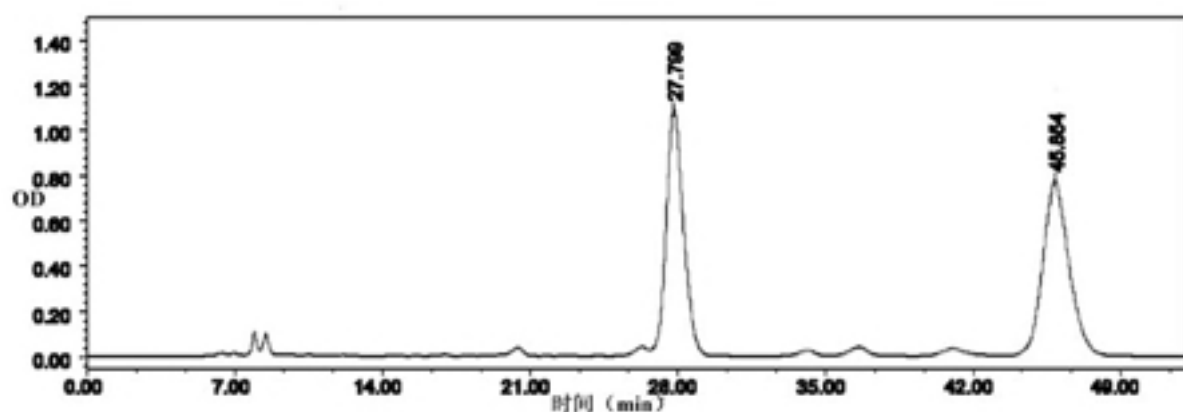
样品: 组分 I, II, III, IV

上样量: 50 μ L

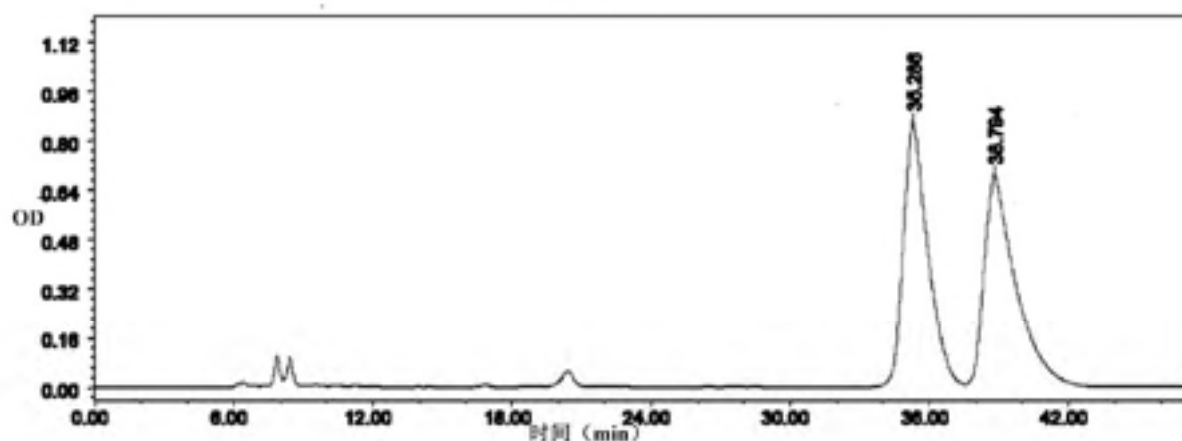
压力: 300 psi



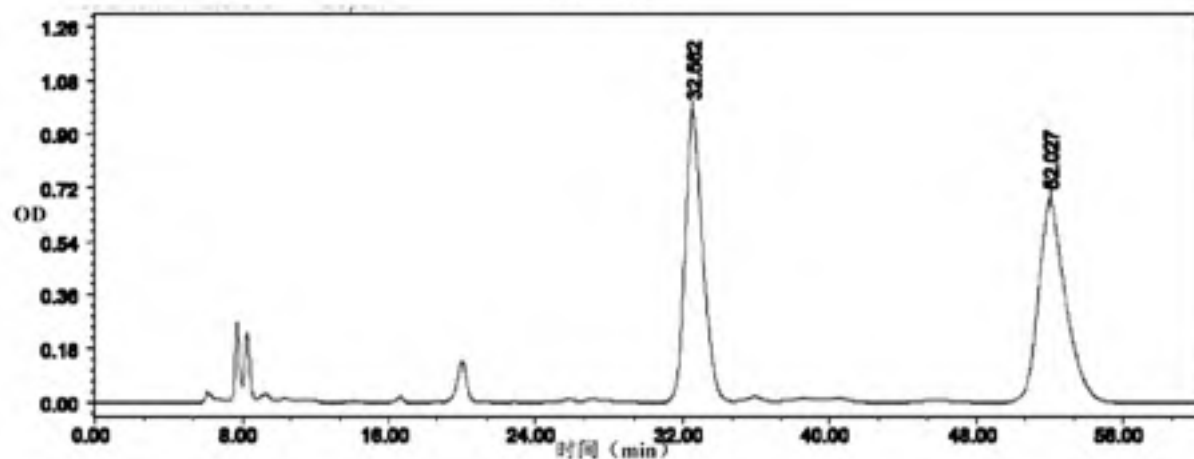
(a) 组分 I



(b) 组分 II



(c) 组分 III



(d) 组分 IV

图 4-2 氯氰菊酯四对对映体在 Sino-Chiral OD 手性柱上的拆分

Fig.4-2 Separation of the enantiomers of cypermethrin using Sino-Chiral OD

由图 4-2 可得，氯氰菊酯的四对对映体在高效硅胶柱上得到了完全分离，分别为组分 I、II、III、IV，每个组分在 150°C 条件下真空旋蒸脱溶后再用 Sino-Chiral OD 柱分离纯化。因为增大了样品的上样量，组分 III 没有得到完全分离，通过变慢流速，延长分离时间最终也实现了基线分离，分别收集 Sino-Chiral OD 柱中流出的 8 个流分，低温浓缩干燥至恒重，置于棕色瓶中，密封，-20°C 保存。

本试验中，CP 采用 Sino-Chiral OD 手性柱的拆分条件同 4.4.1.1，样品溶液配制方法同 4.4.1.1，浓度为 10.8 mg/mL，上样量为 5 μ L，参考文献^[99]手性色谱柱拆分的结果见图 4-3

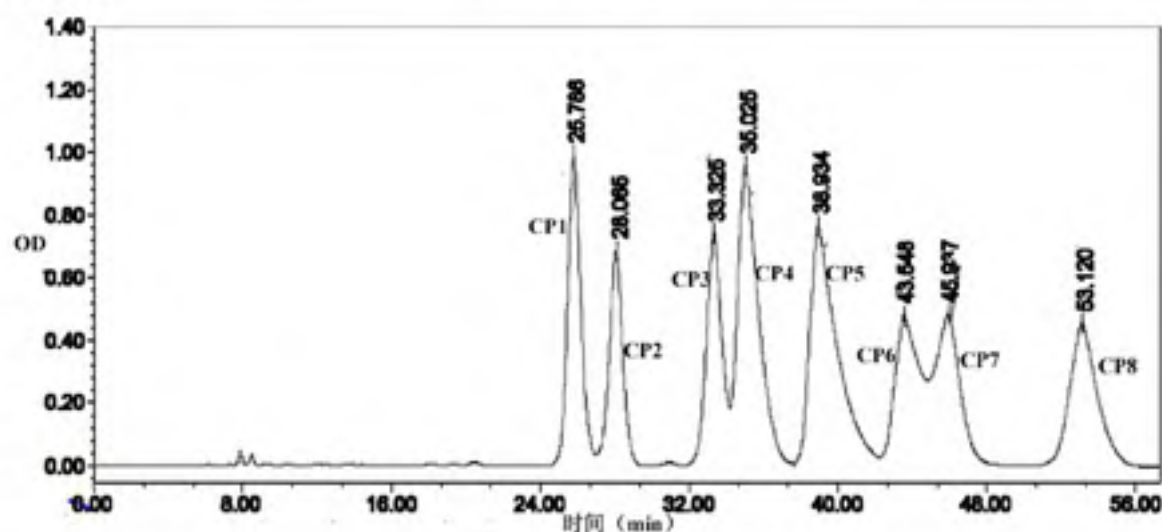


图 4-3 氯氰菊酯的对映体在 Sino-Chiral OD 手性柱上的拆分结果

Fig.4-3 Separation of the enantiomers from cypermethrin using Sino-Chiral OD

本试验结合参考文献^[99]和每个流分在 Sino-Chiral OD 手性柱上的保留时间对照，确定了 CP 每个单体的构型，结果见表 4-1。

表 4-1 CP 单体构型的鉴定

Table 4-1 The configuration identification of CP isomer

CP 对映体	峰数	保留时间 (min)	构型	出峰顺序 Sino-Chiral OD
I	1	25.84	1R 3R α R	1
	2	43.87	1S 3S α S	6
II	1	27.8	1R 3R α S	2
	2	45.86	1S 3S α R	7
III	1	35.28	1R 3S α R	4
	2	38.79	1S 3R α S	5
IV	1	32.56	1S 3R α R	3
	2	52.03	1R 3S α S	8

由表 4-1 可得，由硅胶柱分离的四个组分中，组分 I 对应手性柱分离的 CP1 和 CP6，组分 II 对应手性柱分离的 CP2 和 CP7，组分 III 对应手性柱分离的 CP4 和 CP5，组分 IV 对应手性柱分离的 CP3 和 CP8。同时，采用 Sino-Chiral OD 手性柱对每个单体纯度进行分析，均达到了 97% 以上，可以用做标准品。

4.4.1.2 氰戊菊酯 (FV) 单体的制备和鉴定

氰戊菊酯具有 2 对对映体，4 个单体，采用了和氯氰菊酯手性拆分相似的试验方法和条件。先称取氰戊菊酯样品 5.45 mg/mL，加流动相 5.0 mL 溶解，经 0.45 μ m 滤膜过滤后，得到氰戊菊酯标准品 1 mg/mL 溶液，上样量为 20 μ L。采用高效硅胶柱分离氰戊

菊酯对映体的分离结果如图 4-4。

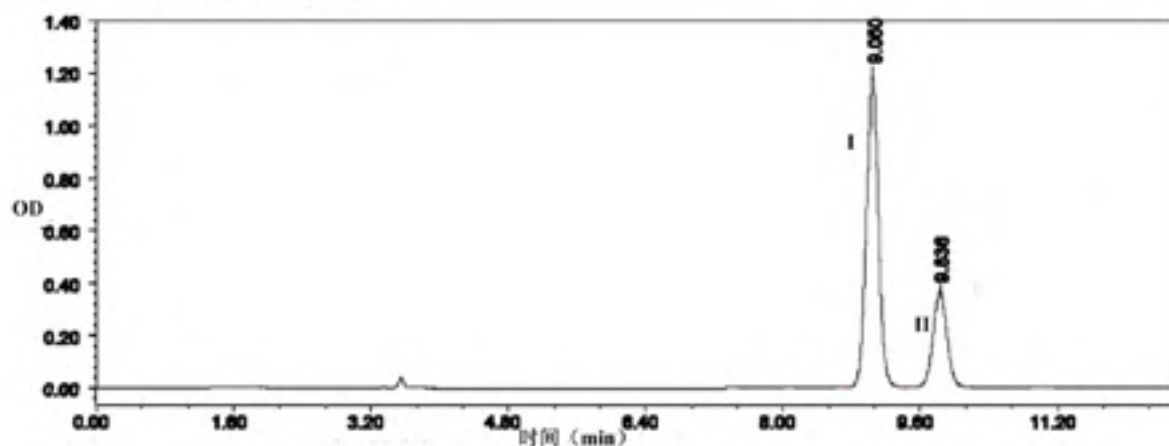
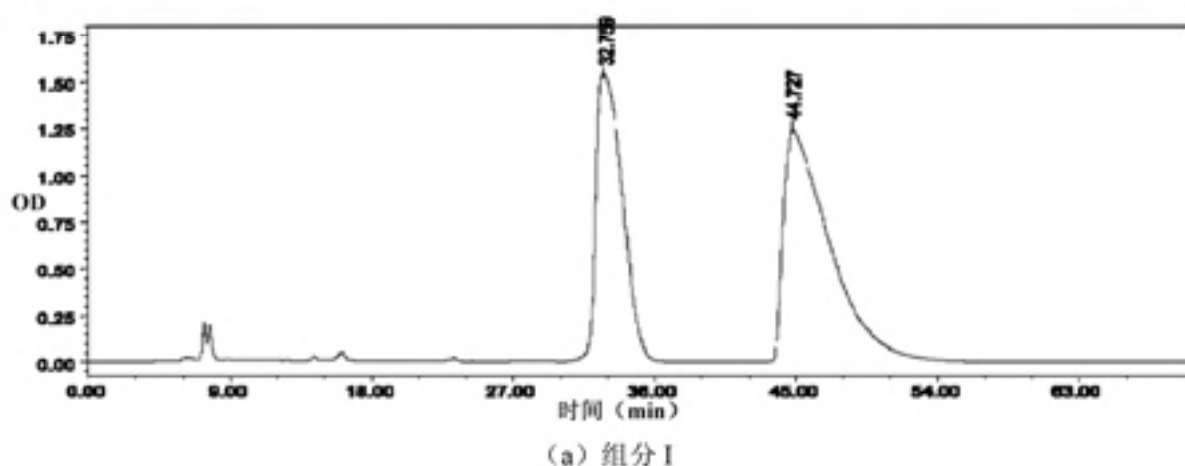


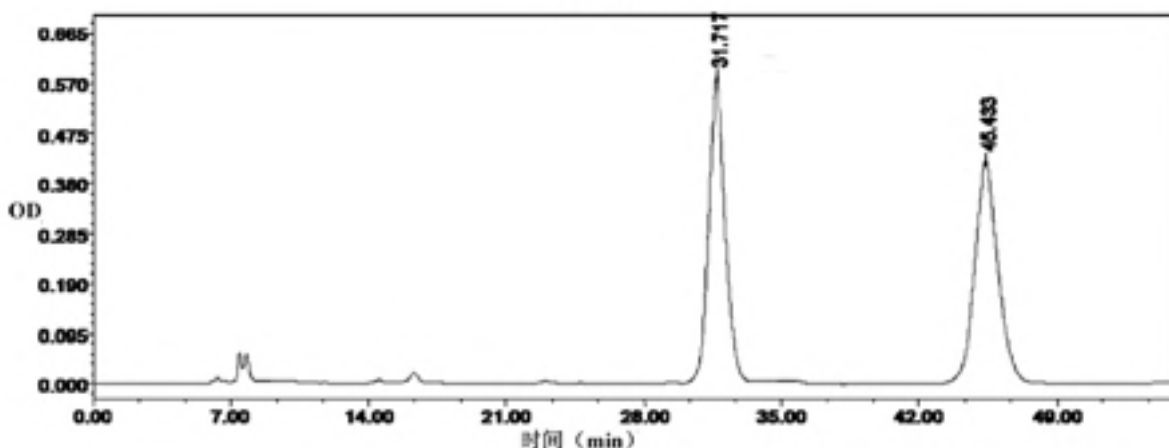
图 4-4 氟戊菊酯对映体在高效硅胶柱上的分离结果

Fig.4-4 Separation of the diastereomers of fenvaleate by a HP-Silica column

由图 4-4 可见，氟戊菊酯（FV）被明显分成了 2 个组分，流出时间分别为 9.05 min 和 9.84 min，同时可以看出，峰 I 的面积明显大于峰 II，说明峰 I 组分在 FV 菊酯的含量较高。



(a) 组分 I



(b) 组分 II

图 4-5 氟戊菊酯对映体在 Sino-Chiral OD 手性柱上的分离结果

Fig.4-5 Separation of the enantiomers from fenvaleate using Sino-Chiral OD

每个组分为一对对映体。每个组分采用 Sino-Chiral OD 手性柱进行第二次拆分。结果如图 4-5。

由图 4-5 可得，组分 I 和 II 分别被 Sino-Chiral OD 手性柱分成了 2 个单体，并且达到了基线分离。在制备氟戊菊酯单体时，最大上样量为 5 mg，通过高效色谱柱分别收集峰 I 号和 II 号纯化液，分别于 150°C 条件下真空旋蒸脱溶后再用 Sino-Chiral OD 柱分离纯化，低温浓缩干燥至恒重。

氟戊菊酯单体构型的鉴定方法和氯氟菊酯相似，结果见表 4-2。

表 4-2 FV 单体构型的鉴定结果

Table 4-2 The configuration identification results of FV isomer

FV 组分	峰数	保留时间 (min)	构型	出峰顺序 Sino-Chiral OD
I	1	32.76	α R, S	2
	2	44.73	α S, R	4
II	1	27.8	α S, S	1
	2	45.86	α R, R	3

由表 4-2 可得，氟戊菊酯在高效硅胶柱上分成组分 I 对应着 Sino-Chiral OD 手性柱分离的 FV2 和 FV4，组分 II 对应着 Sino-Chiral OD 手性柱分离的 FV1 和 FV3。同时，采用 Sino-Chiral OD 手性柱对每个单体纯度进行分析，均达到了 97% 以上，可以用做标准品。

4.4.1.3 甲氧菊酯单体的制备和鉴定

甲氧菊酯只含有 2 个单体，R 型和 S 型。直接采用 Sino-Chiral OD 手性柱进行分析和制备。样品浓度 1.0 mg/mL，上样量 20 μ L。试验条件同 4.3.1.1，结果见图 4-6

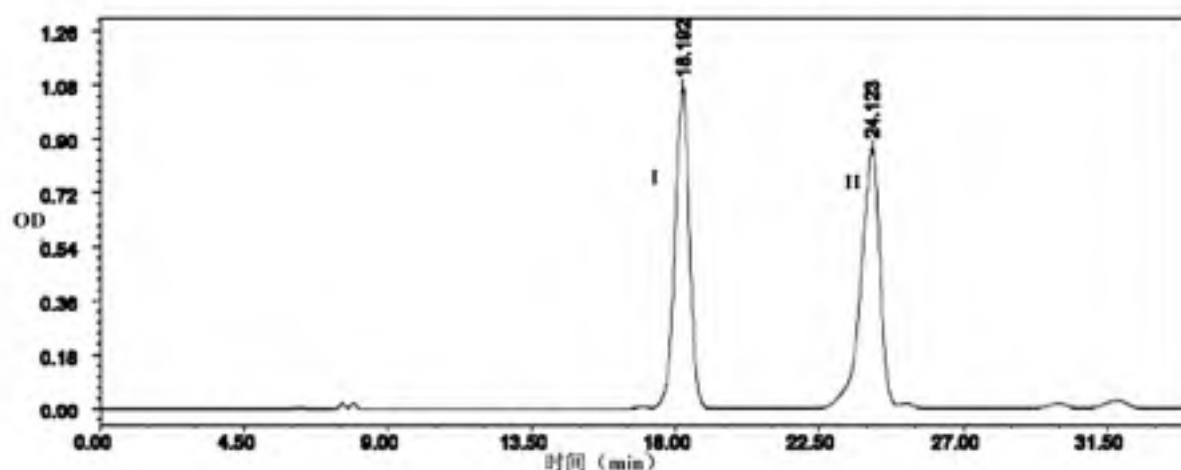


图 4-6 甲氧菊酯在 Sino-Chiral OD 手性柱上的分离

Fig.4-6 Separation of the fenpropathrin using Sino-Chiral OD

由图 4-6 可得，甲氧菊酯通过手性柱被分成了 2 个组分，参考相关文献^[74]，表明组分 I 的构型为 R 型，组分 II 的构型为 S 型。同时将得到的流分进行低温浓缩，干燥至恒重。

此外，通过 Sino-Chiral OD 手性柱分析单体纯度，达到 97% 以上，可以做标准品

用。

4.4.2 群选择性抗体对各种单体抑制的测定

群选择性单克隆抗体的立体选择性通过测定氯氰菊酯、甲氰菊酯和氟戊菊酯的 14 个单体的抑制来研究。试验条件包被原 H5-B 浓度 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ，mAb 的浓度 0.06 $\mu\text{g/mL}$ ，按照 2.3.6 的操作步骤进行测定，结果见表 4-3。

表 4-3 氯氰菊酯、甲氰菊酯和氟戊菊酯单体的 IC_{50}

Table 4-3 IC_{50} values of cypermethrin isomers, fenpropathrin isomers and fenvalerate isomers

菊酯名称	单体	构型	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
氯氰菊酯 (CP)	CP1	1R, 2R, α R	-
	CP2	1R, 2R, α S	-
	CP3	1S, 3R, α R	-
	CP4	1R, 3S, α R	-
	CP5	1S, 3R, α S	-
	CP6	1S, 3S, α S	90
	CP7	1S, 3S, α R	3
	CP8	1R, 3S, α S	-
甲氰菊酯 (FP)	FP1	R	-
	FP2	S	10
氟戊菊酯 (FV)	FV1	S, α S	50.0
	FV2	S, α R	-
	FV3	R, α R	-
	FV4	R, α S	-

由表 4-3 可以看出，mAb 仅识别氯氰菊酯的 8 种单体中的 2 种，单体 7 (CP7, 1S 3S α R) 和单体 6 (CP6, 1S 3S α S)，而且抗体对 CP7 灵敏度远高于 CP6，同时，mAb 分别识别甲氰菊酯的单体 2 (FP2, α S) 和氟戊菊酯的单体 1 (FV1, α S S)。根据菊酯群选择性抗体灵敏识别的 3 种单体 CP6, FP2 和 FV1 构型，可以得出， α 碳原子的 S 型构型更容易被制备的 mAb 所识别。同时 CP6 和 CP7 中环丙烷 C1, C3 的构型都是一致的 (顺式)，FV1 也是顺式的，由此得出，制备的 mAb 可能更容易识别顺式构型的单体。由于菊酯旋光异构如遇碱，见光和有机溶剂时会不稳定，易发生构型的转化和降解，因此免疫原免疫小鼠后，半抗原不同单体在体内的降解速度不同导致抗体识别单体种类的差异。

4.4.3 QSAR 模型分析

4.4.3.1 2D-QSAR

2D-QSAR 模型是基于菊酯类群选择性抗体交叉反应的 IC_{50} 和主要结构参数的多元线性回归分析获得的。2D-QSAR 模型的 Hansch 方程如下：

$$-\text{pIC}_{50} = -7.149 + 0.280 (\text{ALogP}) - 13.277 (\text{Molecular-Fractional Polar Surface Area}) - 0.894 (\text{Num-AromaticRings}) + 0.186 (\text{Num-H-Acceptors}) - 1.730 (\text{Num-H-Donors}).$$

由图 4-7 可得，2D-QSAR 模型， $R^2=0.927$ ， $N=12$ ，最小平方差=0.0180，其中高效氯氰为测试集， $-pIC_{50}$ 实验值为 2.84，通过模型验证的值为 3.04。由此可见，该模型具有较好的预测能力。同时从模型可以看出，抗体的识别能力和菊酯农药分子的疏水性大小和氢受体的个数有关。其中，抗体活性和菊酯分子的疏水性相关性最大，疏水性越小，抗体的识别能力可能会越好。

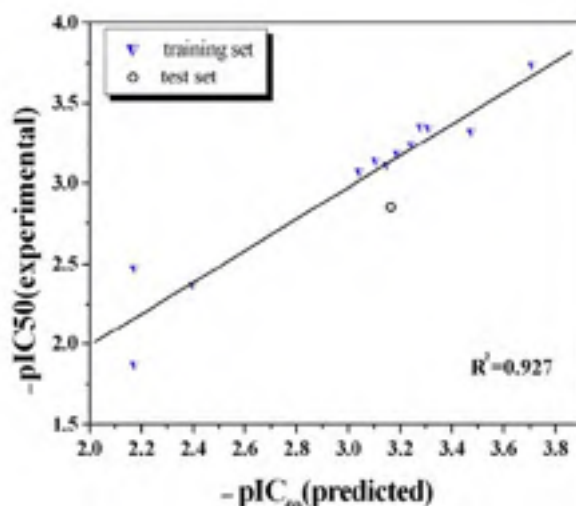


图 4-7 试验 pIC_{50} 和 2D-QSAR 模型预测 pIC_{50} 的线性拟合图

Fig.4-7 Plot of predicted 2D-QSAR model versus experimental pIC_{50} values

4.4.3.2 HQSAR

为了从亚结构水平上揭示抗原抗体的相互作用，建立 HQSAR 模型。选择和 2D-QSAR 同样的训练集和测试集，构建的 HQSAR 模型， $q^2=0.924$ ，全息片段的长度为 61，优化的主成分是 4，分子片段的类型是 B/C/Ch。试验 pIC_{50} 和预测 pIC_{50} 回归分析结果见图 4-8

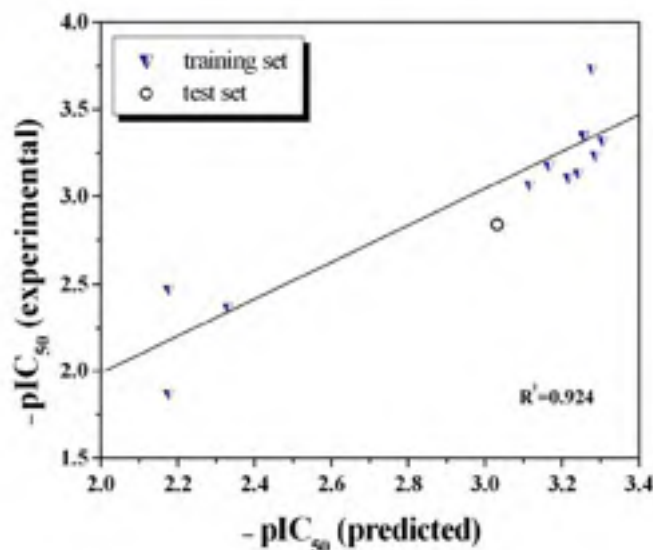


图 4-8 试验 pIC_{50} 和 HQSAR 模型预测 pIC_{50} 的线性拟合图

Fig.4-8 Plot of predicted by HQSAR model versus experimental pIC_{50} values

从模型中可以看出，化学键的类型、连接数和化合物的手性对抗体活性有很大的

相关性。如顺式氯戊菊酯是氯戊菊酯的单体之一，其活性也比较高。也就是说，抗体往往识别的是菊酯农药中某一种单体，所以抗体对混旋体的识别能力往往都较低。而且若抗体对某种菊酯的识别能力比较差时，也有可能由于抗体所识别单体的含量特别低造成的。此外，认为分子中 α 氯基对菊酯的抗体识别有正贡献。如在抗体识别的各种菊酯中，灵敏度高的均为含 α 氯基的菊酯。根据氯氟菊酯和高效氯氟菊酯的 IC_{50} 分别为 2.9 ng/mL and 698.2 ng/mL，其中氯氟菊酯含有 8 个单体，而高效氯氟菊酯含有 4 个单体（其构型分别为 1R, 3R, α S; 1R, 3S, α S; 1S, 3S, α R; 1S, 3R, α R），结合 4.3.2 的结果，抗体主要识别构型是 1S, 3S, α S (CP6) 和 1S, 3S, α R (CP7)，但是 CP6 的灵敏度比较差，加上高效氯氟菊酯是 4 种混旋体，所以活性比较低。因此，抗体活性和分子的手性有很大的相关性。

分子不同片段的抗体活性用不同的颜色进行编码，从下往上颜色变化，代表对抗体活性识别能力越来越好。如红色和桔色的片段代表对抗体活性有负贡献，分子中这两种颜色的结构越多，表明分子的抗体活性就越差。分子中绿色和黄色的片段代表对抗体活性有正贡献，分子中这两种颜色的结构越多，对抗体的识别能力就越好。不同菊酯片段的指纹图谱见图 4-9。

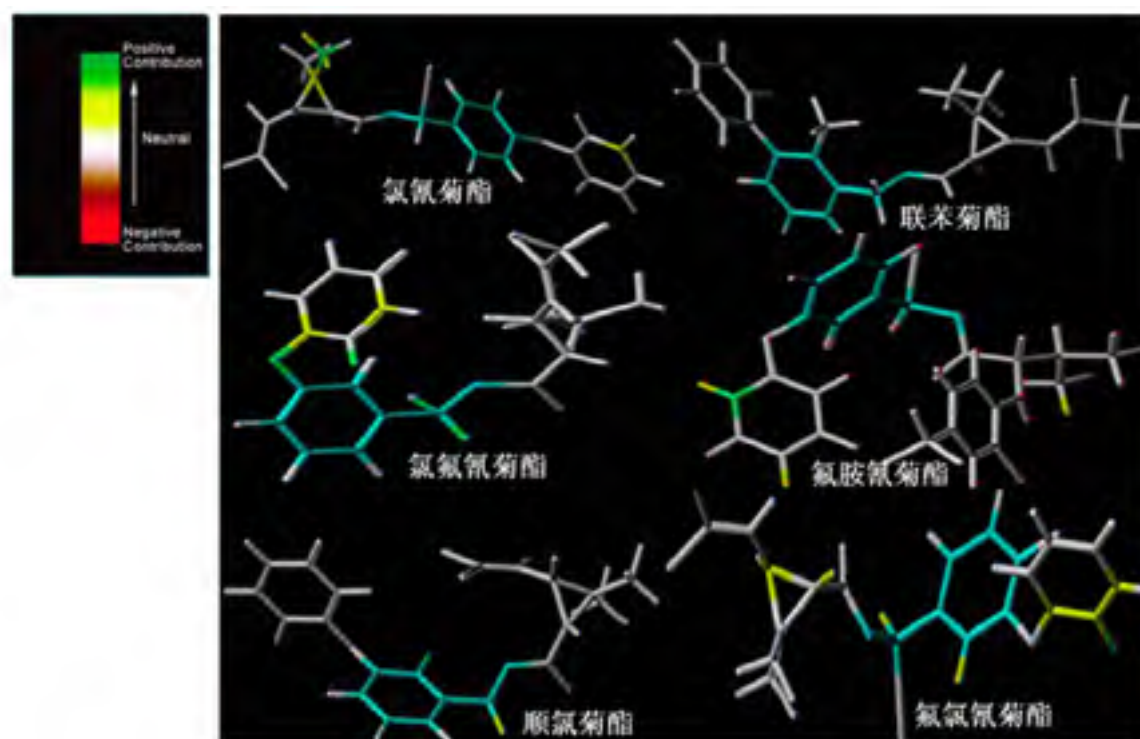


图 4-9 HQSAR 模型中分子片段对抗体识别的全息图

Fig.4-9 Fragments' contribution to antibody recognition based on HQSAR analysis

由图 4-9 可见，菊酯分子中的间苯氧苯甲基结构在 HQSAR 模型编码的颜色变化不大，这一部分结构是菊酯的共同结构，正好体现了菊酯分子中酸部分差异导致了抗体活性的变化。例如氯氟菊酯的环丙烷部分呈现了较多的绿色和黄色，所以其抗体活性最高。联苯菊酯和顺式氯菊酯分子中仅在中间的苯环及与之相连的碳原子上呈现浅蓝色，没有

基团显示高抗体活性的绿色，所以这两种菊酯的抗体活性比氯氰菊酯差很多。由此可见，试验结果和HQSAR模型的预测结果有一定的相关性，不过HQSAR的预测结果不是很满意，可能因为参数选择问题，导致理论计算结果有偏差等。

4.4.3.3 Topomer-QSAR 模型构建

试验以氰戊菊酯为例将各种化合物切成三段 R1, R2 和中间共同部分（见图 4-10）。由于中间部分和 R1 部分在整个分子中贡献相似。因此，关键比较是 R2 片段。

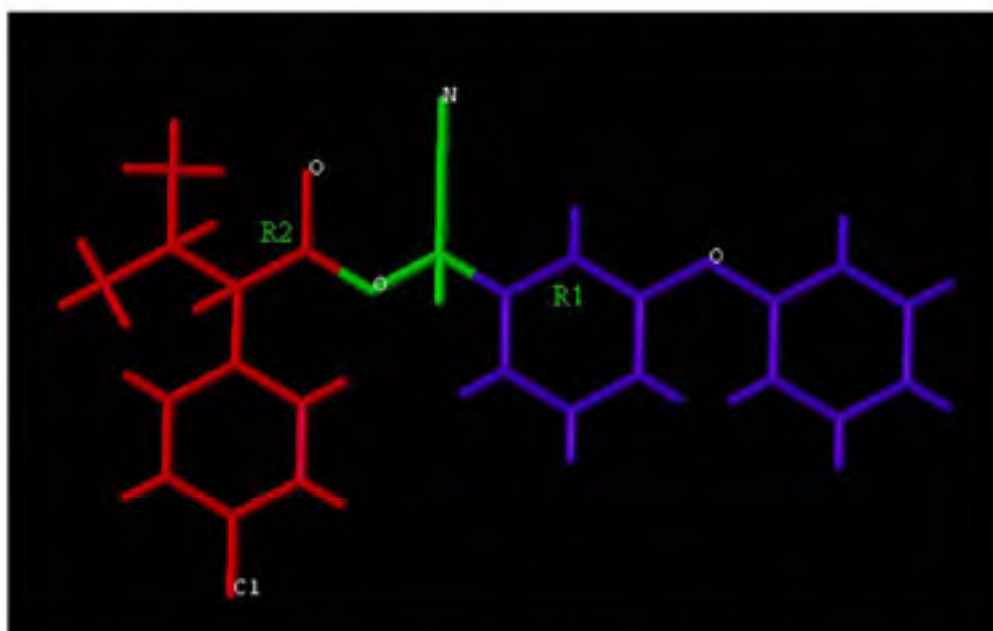
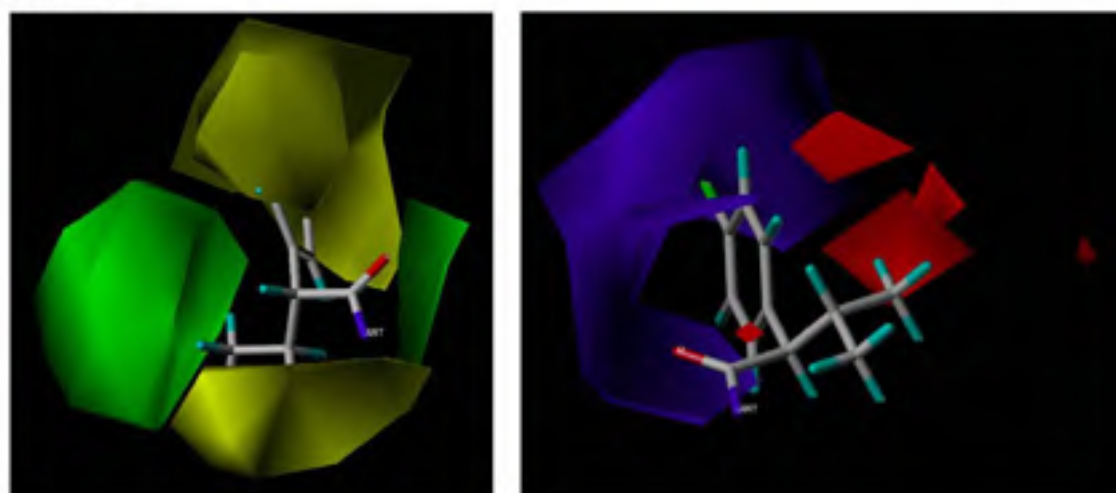


图 4-10 以氰戊菊酯为例说明分子切割图

Fig. 4-10 The cutting image of fenvalerate

利用 sybyl1.2 软件计算 R2 片段的空间场和静电场的等高势，构建的 Topomer-QSAR 模型见图 4-11。



(a) 空间场的等高势图

(b) 静电场的等高势图

图 4-11 片段 R2 的空间场(a)和静电场(b)的等高势图

Fig.4-11 Steric contour map (a) and electrostatic contour map (b) of fragment R2

利用 topomer CoMFA 分析，产生 $R^2=0.890$ ，主成分数=2。由图 4-11 可见，图中绿

色部分代表增加化学物此部位的空间结构对抗体活性有正贡献，黄色代表增加化学物此部位空间结构对抗体活性有负贡献。如甲氟菊酯黄色区的基团比较小，仅有两个-CH₃，所以其抗体活性好。而氟胺氟菊酯因为黄色区的基团为带苯环的结构，空间场比较大，所以其抗体活性较差。

图中蓝色部分代表增加化合物此位置的正电荷对于活性有正贡献，红色表示增加化合物此位置的负电荷对抗体活性有负贡献。如氟戊菊酯分子中的 R₂ 结构中的苯环，正处于蓝色区域，增加了该位置的正电荷，所以其抗体活性相对比较好。而半抗原 2 分子中氧原子正处于图 4-11 (b) 的红色区，增大了该位置的负电荷，所以其抗体活性比较差。

4.5 本章小结

1. 采用 HP-硅胶柱对氟菊酯和氟戊菊酯的对映体进行了拆分，其中氟菊酯和氟戊菊酯分别被分成了 4 对和 2 对。然后利用 Sino-Chiral OD 手性柱对对映体进行第二次拆分，氟菊酯和氟戊菊酯分别被拆分为 8 个单体和 4 个单体。甲氟菊酯直接利用 Sino-Chiral OD 手性柱拆分成 2 个单体。同时利用 Sino-Chiral OD 手性柱结合文献比对，鉴定了每个单体的构型并确定了每个单体的纯度。

2. 通过测定菊酯群选择性单克隆抗体对氟菊酯、氟戊菊酯和甲氟菊酯的 14 个单体的交叉反应来研究单克隆抗体的立体选择性。结果表明，单克隆抗体能够识别氟菊酯的 CP6 (1S 3S α S) 和 CP7 (1S 3S α R)、甲氟的 FP2 (α S) 以及氟戊菊酯 FV1 (α S, S)，而且 CP7 比 CP6 灵敏度要高很多。由此可见，分子中 S 型 α 碳原子和环丙烷顺式构型的单体更容易被菊酯群选择性单克隆抗体所识别。

3. 基于菊酯群选择性单克隆抗体交叉反应的结果，构建了三种定量构效模型包括即二维定量构效模型 (2D-QSAR)、全息定量构效模型 (HQSAR) 和虚拟定量构效模型 (topomer QSAR) 模型。由 2D-QSAR 模型得出，抗体的识别能力和菊酯的疏水性大小、氢受体的个数有关，而且菊酯的疏水性越小，抗体的识别能力可能会越好。由 HQSAR 模型得出，抗体活性和分子中化学基团 (α 氟基)、化学键的类型、连接数 and 化合物的手性和抗体活性有很大的相关性。由 HQSAR 模型分子全息图得出，在免疫反应中暴露比较少的片断，对抗体活性也有一定的影响。2D-QSAR 模型和 HQSAR 模型的交叉验证系数 $q^2=0.92$ ，表明这两个模型具有很好的预测能力，Topomer QSAR 模型通过分析分子差异性片段 R₂ 空间场和静电场的等高势和抗体活性变化之间相关性建立的，用于解释菊酯群选择性抗体的交叉反应。

第五章 氯氟氰菊酯单克隆抗体的制备及其酶联免疫检测方法的建立

5.1 引言

氯氟氰菊酯又叫功夫菊酯 (cyhalothrin, CAS 号 91465-08-6), 其化学名称: (IR)-顺式-(Z)-2,2-二甲基-3-(2-氯-3,3,3-三氟-1-丙烯基)环丙烷羧酸-(S)- α -氰基-3-苯氧基苄酯/(IS)-顺式-(Z)-2,2-二甲基-3-(2-氯-3,3,3-三氟-1-丙稀基)环丙烷羧酸-(R)- α -氰基-3-苯氧基苄酯(1:1 的混合物), 属于拟除虫菊酯类第三代含氟农药, 可防治果树、蔬菜、棉花、烟草、玉米等作物的害虫和螨类。另外, 将氯氟氰菊酯与溴氰菊酯混用, 还可以用来杀灭跳蚤, 具有极强的触杀和胃毒作用, 而且残效期长, 耐雨水冲刷。

随着氯氟氰菊酯的广泛应用, 已经对生态环境造成了一定的影响。毒理学研究表明, 氯氟氰菊酯会诱导动物的生殖毒性、肝毒和肾毒^[26, 155, 156]。同时研究还表明, 氯氟氰菊酯对于鱼类和水生节肢动物具有高毒性, 对鱼类和水生的节肢动物的 LC_{50} (50% lethal concentration) 小于 3 ppb^[9]。因此, 研究水环境体系中氯氟氰菊酯的检测具有十分重要的意义。

尽管菊酯类农药的免疫学研究已经有几十年的历史, 但是氯氟氰菊酯属于第三代拟除虫菊酯类农药, 再加上其半抗原合成难度大, 所以关于该菊酯的免疫分析报道非常少^[42]。如 2006 年, 中国农业大学的高宏斌等人建立了检测水样中氯氟氰菊酯的酶联免疫分析法。该法制备了抗氯氟氰菊酯的多克隆抗体, 抗体 IC_{50} 37.2 ng/mL, 检测限为 4.7 ng/mL。和多克隆抗体相比, 单克隆抗体更容易重复生产, 质量相对稳定, 特异性强。所以本章制备了氯氟氰菊酯的特异性单克隆抗体, 并建立了检测氯氟氰菊酯的酶联免疫分析法。

5.2 试剂与仪器

5.2.1 试验试剂

各种菊酯标准品 (氯氟氰菊酯; 氟胺氰菊酯; 苯醚氰菊酯; 氯氰菊酯; 甲氰菊酯; 联苯菊酯; 氯氟氰菊酯; 纯度均在 98%以上, 购自天津市东方绿色技术发展公司。亚硝酸钠; N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS); 碳二亚胺 (EDC); 羧基二咪唑 (CDI); 3-间苯氧基甲酸 (PBA); 牛蓝蛋白 (KLH); 牛血清白蛋白 (BSA); 鸡卵清蛋白 (OVA); 四甲基联苯胺 (TMB); 聚乙二醇 (PEG); 二甲基亚砜 (DMSO); 购自 sigma 公司。功夫菊酸 武汉金诺化工有限责任公司; 快速佐剂 北京康碧泉生物有限公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 Ig (HRP-Ig G) 购自康成生物工程公司。1640 培养基; L-谷氨酰胺; 双抗; 次黄嘌呤-氨基嘌呤-胸腺嘧啶脱氧苷 (HAT); 次黄嘌呤-胸腺嘧啶脱氧核苷 (HT) 均购自南京生兴生物工程公司。试验用水为 Millipore 系统制备的超纯水。碳酸钠; 碳酸氢钠; 氯化钠; 磷酸氢二钠; 磷酸二氢钠; 磷酸二氢钾; 柠檬酸; 双氧水; 四甲基联苯胺 (TMB); 浓硫酸。以上试剂及试验中的普通试剂均购自阿拉丁

试剂公司，如无特殊说明，均为分析纯。

5.2.2 试验动物

选择 6-8 周龄 BALB/c 雌性小鼠为实验动物，购自扬州大学比较医疗中心

5.2.3 试验仪器

ACS-304 型电子天平（上海第二天平仪器厂）；AB104-N 分析电子天平（梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司）；Milli-Q Integral Cabinet 3 超纯水制备仪（美国的 Millipore 公司）；可调式移液器（Eppendorf）UV-1800 型紫外扫描仪（日本津岛）；MKs 型酶标仪（上海雷勃分析仪器厂）；双通道数控型注射乳化器（保定兰格自动化技术有限公司）；101A-2 电热鼓风干燥箱（上海实验仪器厂）；SP-250A 生化培养箱（南京实验仪器厂）；三星 BCD-233WNG 冰箱（苏州三星电器有限公司）；R686VLT-1386-3V 超低温冰箱（美国）；YDS-10 液氮罐（乐山市东亚机电工贸有限公司）；MALDI SYNAPT QToF MS 超液相色谱串联四极杆飞行时间质谱仪（美国 Waters 公司）；AVANCE III 400MHz 全数字化核磁共振谱仪（德国 Bruker, Billerica, ME）；磁力搅拌器（上海沪西仪器公司）；PHS-3B 酸度仪（海精科雷磁仪器厂）；RE-52AA 旋转蒸发器（上海青浦沪西仪器厂）；倒置显微镜（德国 Leica 公司）；Thermo 3111 型 CO₂ 培养箱（Thermo Labsystems 公司）；SW-CJ-IPO 超净工作台（苏州富泰洁净系统有限公司）；数显恒温磁力搅拌器（金坛市荣华仪器制造有限公司）；TDL-60B 台式低速离心机（无锡市瑞江分析仪器有限公司）；XW-80A 旋涡混合器（上海精科实业有限公司）；八道可调移液器（美国热电公司）；DSC-W300 数码照相机（SONY 有限公司）；SHB-III 循环水真空泵（巩义市予华仪器有限公司）；KQ-250B 超声波清洗机（上海科导超声仪器厂）；LDZX-50KB 不锈钢立式灭菌器（上海天成科技有限公司）

5.3 试验方法

5.3.1 半抗原的合成

5.3.1.1 半抗原 1 的合成

半抗原 1 合成是通过改进文献中^[45]方法进行的，具体合成路线(见图 5-1)。本试验以对羟基苯丙酸为原料，通过 7 步反应，得到功夫菊酯的半抗原，采用液质联用技术和质谱核磁共振技术对重要中间产物和终产物进行鉴定和分析。

1. 4-羟基苯丙酸苄酯（化合物 1）的合成

在 100 mL 圆底烧瓶中加入（5.0 g, 30.1mmol）对羟基苯丙酸，（3.4 g, 34.0 mmol）碳酸氢钾（KHCO₃），15mL N,N'-二甲基甲酰胺（DMF），然后再加入（8.0 g, 46.8 mmol）苄基溴（BnBr），室温搅拌过夜，反应结束后，反应液用乙酸乙酯稀释，然后用饱和 NaHCO₃ 溶液洗涤 3 次，蒸馏水洗涤 2 次，最后用饱和食盐水洗涤 2 次。取有机相干燥，浓缩，柱层析纯化得到无色粘稠液体 4-羟基苯丙酸苄酯 6.9 g，收率约 89.4%。

2. 3-（二甲氧基甲基）溴苯（化合物 2）的合成

在 100 mL 圆底烧瓶中加入（7.4 g, 40.0 mmol）间溴苯甲醛，（17.0 g, 160.0 mmol）

原甲酸三甲酯，(74 mg, 0.4 mmol) 对甲苯磺酸 (TsOH)，然后在 105°C 下加热搅拌 3 h，停止反应，减压蒸馏，反应液用乙酸乙酯稀释，然后用饱和 NaHCO₃ 溶液洗涤 3 次，蒸馏水和饱和食盐水各洗涤 2 次。取有机相干燥，浓缩，即得无色粘稠液体 3-(二甲氧基甲基)溴苯 7.4 g，收率 80.1%。

3. 4-(3-甲醛苯氧基)苯丙酸苄酯(化合物 3)的合成

在 100 mL 三口瓶中加入 (5.2 g, 20.3 mmol) 4-羟基苯丙酸苄酯，30 mL 无水 N,N'-二甲基甲酰胺 (DMF)，冰浴至 0-5°C，在氮气保护下然后分批加入 (1.3 g, 30.5 mmol) NaH，加完后搅拌 1 h，撤去冰浴，然后加入 (7.0 g, 30.3 mmol) 3-(二甲氧基甲基)溴苯，(1.8 g, 18.0 mmol) 氯化亚铜 (CuCl)，(0.9 g, 14.0 mmol) 铜粉，(1.0 g, 2.78 mmol) 18-冠醚-6 (18-Crown-6)，然后再加入 4.8 mL 吡啶 (pyridine)，在氮气保护下 150°C 加热回流 8 h，停止反应后，室温冷却，反应液用乙酸乙酯稀释，然后用 10% HCl 洗涤二次，再加入 10% HCl 10 mL 搅拌 2 h，水洗 3 次，合并有机层，干燥，浓缩，柱层析纯化，即得淡黄色油状物 4-(3-甲醛苯氧基)苯丙酸苄酯 4.3 g，收率 58.8%。

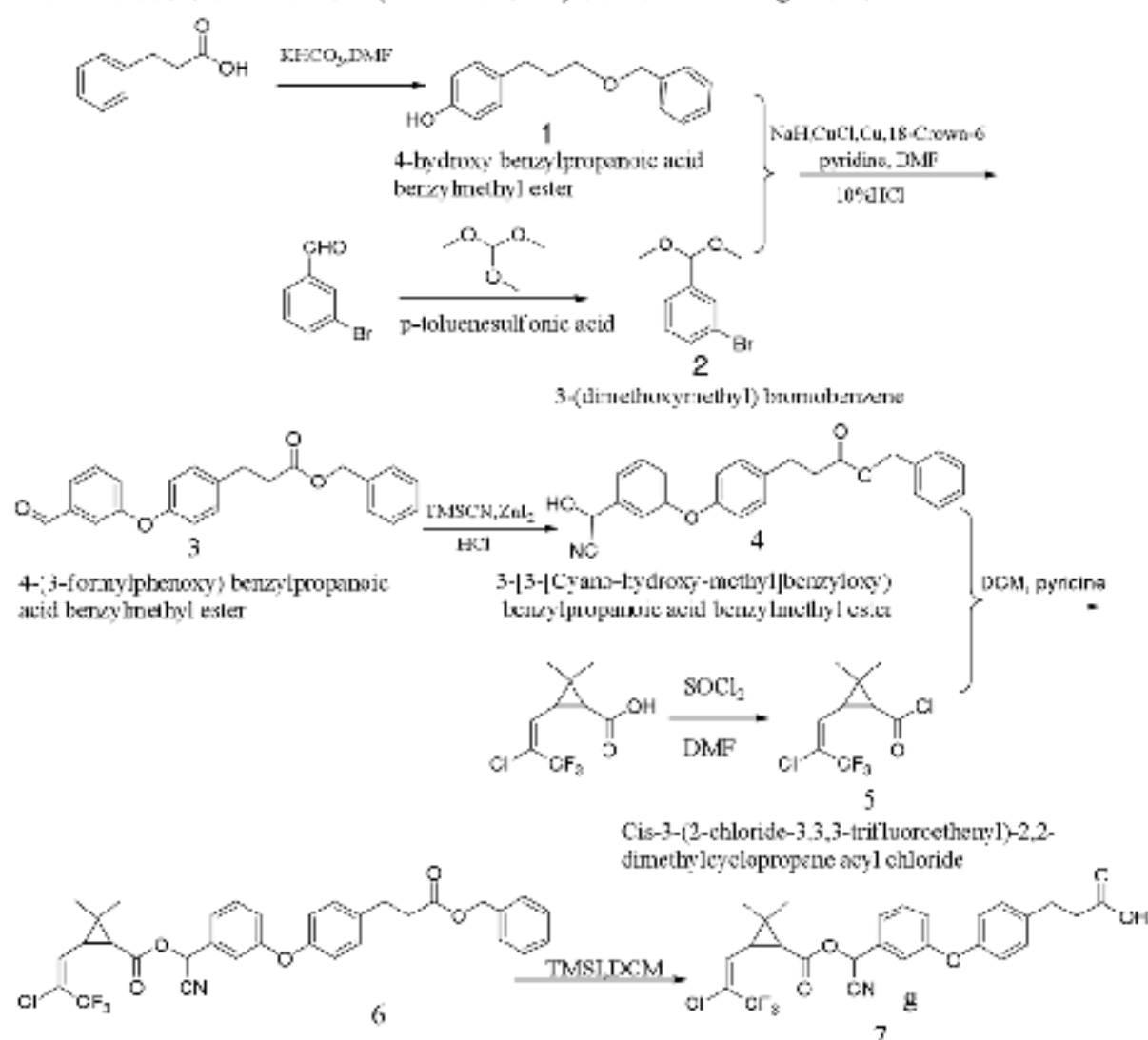


图 5-1 半抗原 1 的合成路线

Fig 5-1 Synthesis scheme of haptin 1

4. 3-[3-[氰基(羟基)甲基]苯氧基]苯丙酸苄酯 (化合物 4) 的合成:

在 50 mL 三口瓶中加入 (3.6 g, 10.0 mmol) 4-(3-甲醛苯氧基)苯丙酸苄酯, 15 mL 无水氯仿, 氮气保护下加入 (60 mg, 0.19 mmol) 碘化锌 (ZnI_2), 冰浴至 0-5°C, 然后分批加入 (1.5 g, 15.2 mmol) 三甲基氰硅烷 (TMSCN), 加完后撤去冰浴, 室温搅拌 2 h。停止反应后, 反应液滴加到 10% 盐酸乙二醇二甲醚溶液 (10:0.7, V/V) 中, 搅拌 0.5 h, 加水 20 mL 稀释, 然后用二氯甲烷 (DCM) 萃取, 取有机层, 干燥, 浓缩, 即得淡黄色油状物 3-[3-[(氰基(羰基)甲基)苯氧基]苯丙酸苄酯, 不经纯化直接用于化合物 6 的合成。

5. 功夫酰氯 (化合物 5) 的合成:

在 50 mL 圆底烧瓶中加入 (4.9 g, 20.2 mmol) 功夫酸, 20 mL 二氯亚砷 ($SOCl_2$), 0.5 mL N,N' -二甲基甲酰胺 (DMF), 然后在 85°C 加热回流 3 h。减压蒸馏除去过量的二氯亚砷 ($SOCl_2$) 后, 反应液用甲苯除去残留的酸性气体, 即得淡黄色液体功夫酰氯, 不经纯化直接用于化合物 6 的合成。

6. 3-[[(- (功夫酰氯) 甲基)苯氧基]苯丙酸苄酯 (化合物 6) 的合成:

在 100 mL 圆底烧瓶中加入 (3.73 g, 10.0 mmol) 化合物 4, 20 mL 无水氯仿, 冰浴下降温, 再加入 (2.51 g, 10.0 mmol) 化合物 5, 然后滴加 (2.5 mL, 30.2 mmol) 吡啶 (pyridine) 和 2.5 mL 氯仿溶液, 加完后撤去冰浴, 室温搅拌 4 h。停止反应后, 反应液加水淬灭, 然后用 10% HCl 洗涤三次, 5% NaOH 洗涤三次, 蒸馏水和饱和食盐水各洗涤 2 次, 分取有机层, 干燥, 浓缩, 柱层析即得淡黄色油状物 3.5 g, 收率 57.2%。

7. 3-[[[(氰基-(功夫酰氯) 甲基)苯氧基]苯丙酸 (化合物 7) 的合成:

在 50 mL 三口瓶中加入 (1.0 g, 1.6 mmol) 化合物 6, 10 mL 二氯甲烷 (DCM), 再滴加入 (0.4 g, 2.0 mmol) 三甲基硅烷咪唑 (TMSI), 加完后室温搅拌 2 h。停止反应后, 反应液加 10 mL 10% HCl 淬灭, 然后合并有机层, 干燥, 浓缩, 大板层析得淡黄色油状物 0.3 g, 收率 35.9%。

5.3.1.2 半抗原 2 的合成

试验以间羟基苯甲醛和对氯硝基苯为原料, 通过 4 步反应合成, 合成路线见图 5-2, 合成的中间产物和终产物采用 LC-MS 和 1H NMR 进行表征。

1. 化合物 8 合成: 250 毫升三口瓶中放入 (7.32 g, 60 mmol) 间羟基苯甲醛, (9.45 g, 60 mmol) 对氯硝基苯, (8.28 g, 60 mmol) 碳酸钾和 100 mL DMF, 150°C 下加热过夜 (16 h), 冷却至室温后倒入 1000 mL 剧烈搅拌的冰水中, 搅拌 15 分钟后静置半小时, 过滤析出的固体, 以水及石油醚依次充分淋洗滤饼 (必要时可在超声波清洗器中超一超, 以清洗过量 DMF), 干燥得 12.2 g 黄棕色固体, 收率 83%;

2. 化合物 9 合成: 50 mL 单口瓶中, 加入 (505 mg, 10.3 mmol) NaCN, 2 mL 水, (500 mg, 2.06 mmol) 化合物 8, 10 mL 四氢呋喃, 搅拌并用橡胶塞封住瓶口, 于冰浴下 (0-5°C) 慢慢注入 1.6 mL 40% 硫酸, 待反应 5 小时后, 薄层层析法 (TLC) 检测原料已经基本反应完 (展开剂: 石油醚/乙酸乙酯=4/1, R_f =0.2), 薄层层析分离 (厚制备 TLC 板, 20cm×20cm, 厚度 0.1 mm) 两次得到一个混合物 280 mg (化合物 8/化合物 9=1/3), 粗收率 38%;

3. 化合物 10 合成

a) 制备功夫酰氯

在 50 mL 单口瓶中，加入(99 mg, 0.41 mmol)功夫酸 及一滴 DMF，溶于二氯甲烷 (DCM, 5 mL)，冰浴搅拌下加入(94 mg, 0.74 mmol)草酰氯，然后室温搅拌 2 h 后，TLC 板检测原料消耗完毕（取样后以甲醇淬灭点板，展开剂：石油醚/乙酸乙酯= 4/1, Rf = 0.5，原料酸爬不动，在原点，也可以用液质监测），旋干溶剂得粗品备用；

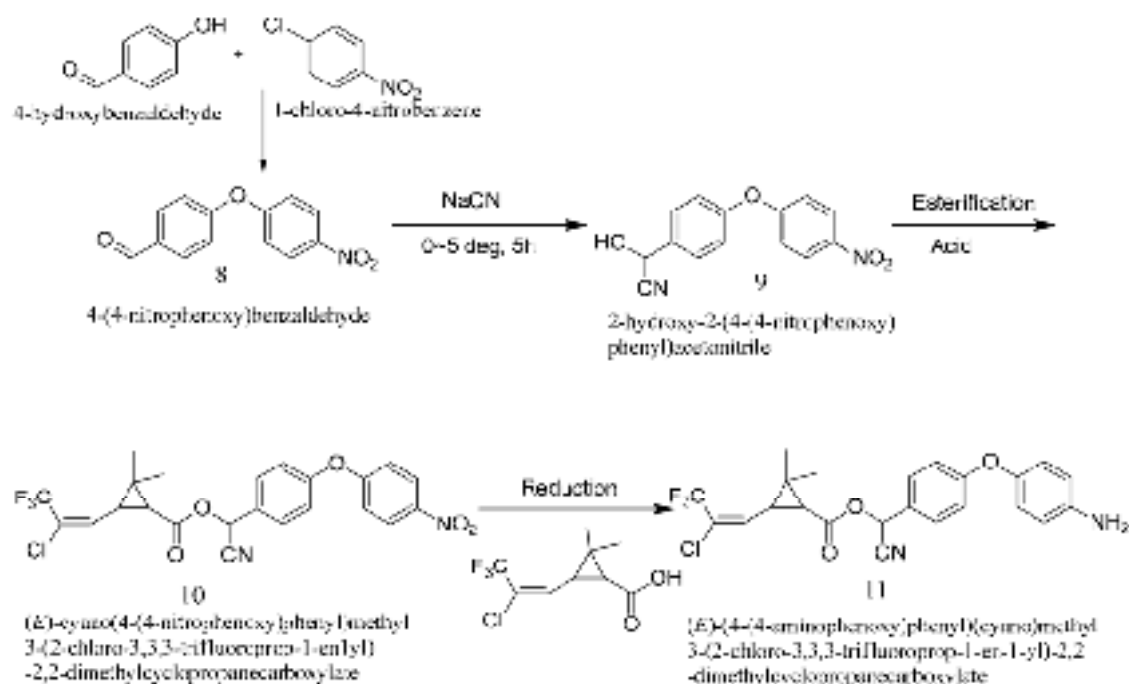


图 5-2 半抗原 2 的合成路线

Fig. 5-2 Synthetic pathway of hapten2

b) 化合物 10 的合成

将第一步所得化合物 9 粗品 (130 mg, 0.37 mmol) 溶于二氯甲烷 (8 mL) 中，冰浴下加入上述所制酰氯的二氯甲烷溶液 (3 mL)，搅拌下缓慢滴加 154 微升三乙胺 (1.11 mmol)，搅拌过夜 (室温 16 h)，水洗 (10 mL)，盐水洗 (10 mL)，无水硫酸钠干燥，过滤，蒸干得粗品，薄层层析分离 (厚制备 TLC 板，20cm×20cm，厚度 0.1mm，展开剂石油醚：乙酸乙酯=10: 1) 得到纯品 50 mg，收率 27%；

4. 化合物 11 合成

将上述所得 50 mg (0.1 mmol) 化合物 10 溶于 MeOH (5 mL)，加入 87 mg 连二亚硫酸钠 (保险粉, 0.5 mmol) 的水溶液 (5 mL) 室温搅拌 4 h，TCL 或 LCMS 监测反应。旋去甲醇，以乙酸乙酯萃取，蒸干溶剂得粗品，得粗品约 16 g，取出 7.5g 经硅胶柱层析得到 1.5 g 较纯品(>85%)，再经反相柱制备纯化得 640 mg 纯品。

5.3.2 抗原的合成

5.3.2.1 免疫原的合成

免疫原 1 由半抗原 1 和 KLH 通过活性酯法相偶联。免疫原 2 由半抗原 2 和 BSA 通过重氮化法合成。具体的操作过程见 2.3.4。

5.3.2.2 包被原的合成

包被原是由半抗原 1 和 BSA, OVA 通过活性能法合成的或由半抗原 2 和 OVA 通过重氮化法合成。具体的操作过程见 2.3.4。

5.3.2.3 免疫原和包被原的鉴定

免疫原和包被原的鉴定也是通过紫外法进行鉴定，具体的操作过程见 2.3.4。

5.3.3 免疫程序

试验选择 6-8 周龄 BALB/c 雌性小鼠为实验动物，购买的小鼠要先适应环境一周，然后开始免疫。每 6 只小鼠为一组，免疫原用 0.08% 无菌生理盐水稀释到 1 mg/mL (以蛋白含量计)，取 50 μ L 免疫原与等体积的快免佐剂混和，充分混匀后，立即免疫小鼠。免疫程序见表 5-1

表 5-1 快免小鼠的免疫程序
Table 5-1 The program of mice immunized by rapid adjuvant

免疫次数	免疫间隔时间 (d)	免疫剂量 (μ g/只)	免疫方式	采血方式
1	21	75	肌肉注射	
2	14	50	同上	尾部采血
3	14	50	同上	尾部采血
4	14	50	同上	尾部采血
5	14	50	同上	尾部采血
6	21	25	腹腔注射	摘眼球采血

5.3.4 抗血清的筛选

试验采用 ic-ELISA 方法测定了 12 种血清对 4 种包被原的效价和抑制，具体的操作过程见 2.3.6。选出效价高并抑制好的小鼠融合。

5.3.5 单克隆抗体的制备

5.3.5.1 杂交瘤细胞株的获得

融合前一周，开始 SP2/0 骨髓瘤细胞的复苏和培养，具体的操作见 2.3.7.1。融合前 3 天，对融合小鼠冲免。

融合当天，第一步，收集 SP2/0 骨髓瘤细胞，事先调整好 SP2/0 骨髓瘤细胞的状态和数量。调整 SP2/0 骨髓瘤细胞大部分处于对数生长期，这一点对于整个融合成败至关重要，如果 SP2/0 骨髓瘤细胞的状态不佳，会导致融合后的细胞死亡。同时 SP2/0 骨髓瘤细胞数量要足。收集 SP2/0 骨髓瘤细胞到 50 mL 的无菌离心管中，离心 (1200 rpm, 6 min)，弃上清，再用 RPMI 1640 培养基进行重悬，计数，备用。第二步，脾细胞的收集，具体的操作见 2.3.7.2。计数，备用。第三步，融合 融合过程采用常规的方法进行，具体的操作见 2.3.7.3。第四步，杂交瘤细胞筛选，采用 ic-ELISA 方法进行筛选。通常进行 3-4 次筛选，直到筛出纯的细胞株为止。采用有限稀释法进行亚克隆。具体的操作见 2.3.7.4。第五步，杂交瘤细胞株的冻存。具体的操作见 2.3.7.6。

5.3.5.2 单克隆抗体制备和纯化

采用体内诱生腹水法进行生产，具体过程见参考文献^[107]。

5.3.6 单克隆抗体的性能测定

5.3.6.1 细胞株和包被原的筛选

试验采用方阵法^[112]筛选3株细胞(1B10, 2C8, 2D9)的腹水和四种包被原(H1-B, H1-O, H2-O, H2-B)的组合,按照背景值低, ODmax 高和 IC₅₀ 低的标准,选择细胞株、包被原的种类及其最适浓度。

5.3.6.2 亲和力测定 具体过程见 2.3.9.1

5.3.6.3 亚型鉴定 具体过程见 2.3.9.2

5.3.7 ELISA 方法的条件优化

本试验优化了影响 ELISA 方法的主要影响因素,包括封闭剂、pH、离子强度和甲醇含量。以氯氟氰菊酯为标准品进行筛选。选择原则是背景噪音低、效价高和 IC₅₀ 低。

研究了封闭液中的不同封闭剂(明胶、OVA、BSA、PVP 和酪蛋白酸钠)对 ic-ELISA 方法的影响。

研究了抗体稀释液中不同离子强度(氯化钠水平 0%, 0.4%, 0.8%, 1.2%, 1.4%)对 ic-ELISA 方法的影响。

研究了抗体稀释液中不同 pH (5.2, 6.4, 7.2, 8.0)对 ic-ELISA 方法的影响。

研究了抗体稀释液中 6 个不同甲醇水平(0%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%)对 ic-ELISA 方法的影响。

5.3.8 灵敏度的测定

在优化条件下,采用 ic-ELISA 方法测定单克隆抗体 2C8 对氯氟氰菊酯浓度在 0-1000 ng/mL 之间的抑制效果,利用氯氟氰菊酯抑制曲线的回归方程计算 IC₅₀。

5.3.9 交叉反应的测定

本试验选择了氯氟氰菊酯的类似物和代谢物来研究抗体的特异性,包括氯氟菊酯、甲氰菊酯、氟胺氰菊酯、氟氯氰菊酯、氟氰戊菊酯、功夫菊酸、间苯氧苯甲酸。化学结构见图 5-3。计算公式见 3.3.3。

5.3.10 添加回收试验

本试验选择了河水、自来水和饮用水三个水样,经 GC-MS 证实不含有氯氟氰菊酯类农药^[114]。试验选择了三个不同水平的添加试验: 200 ng/mL, 1000 ng/mL, 5000 ng/mL; 河水需要经过滤纸过滤简单处理,然后和自来水、饮用水用 20%甲醇-PBS 稀释后,采用 ic-ELISA 进行测定,同时进行板间差异和批间差异的评估,每个实验设定 6 次重复,连续 3 天进行测定。

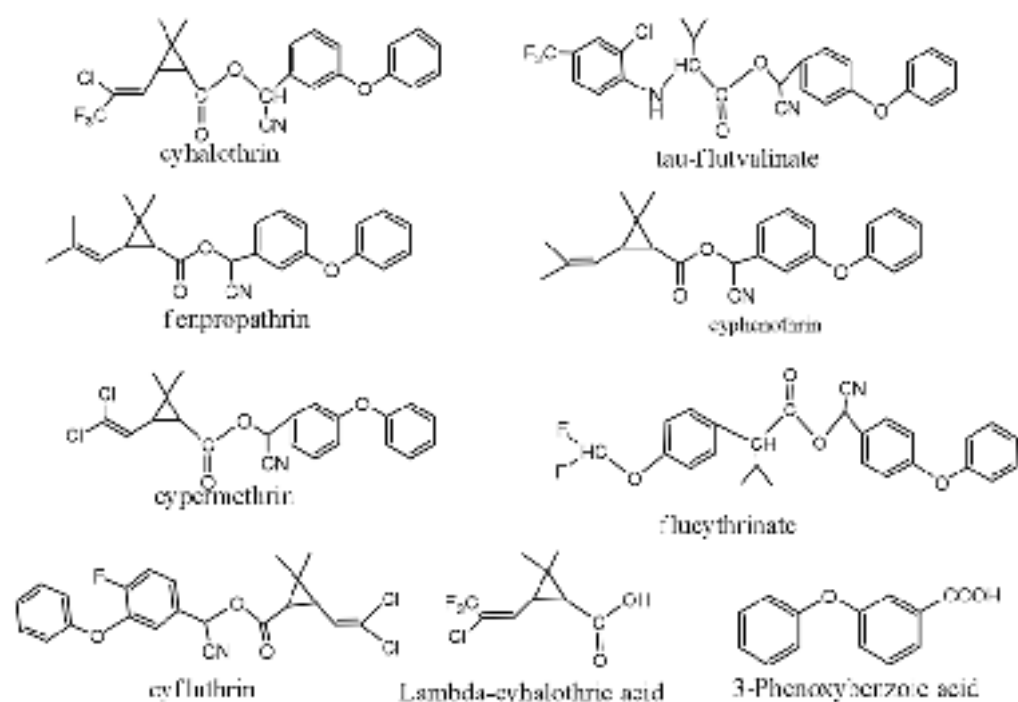


图 5-3 氯氟氰菊酯类似物和代谢物的结构图

Fig 5-3 The structures of cyhalothrin analogs and metabolites

5.4 结果与分析

5.4.1 半抗原的合成和鉴定

5.4.1.1 半抗原 1 (H1) 合成中间产物和终产物的鉴定图谱

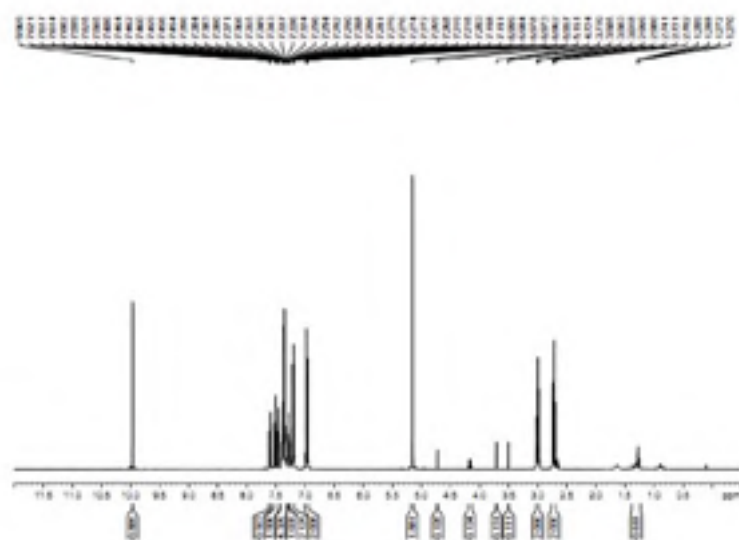
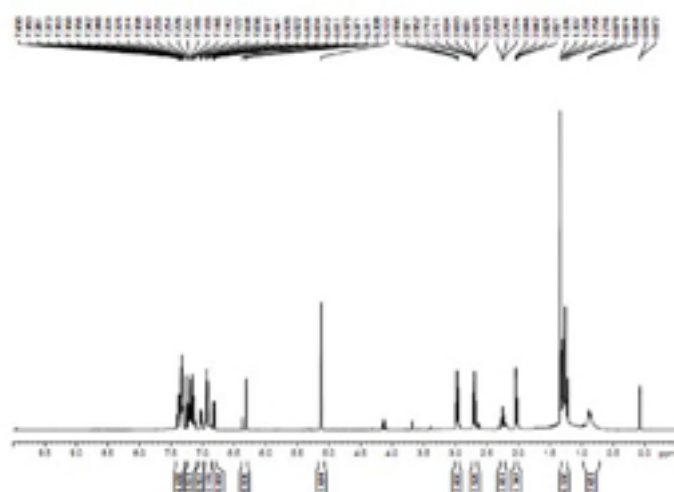


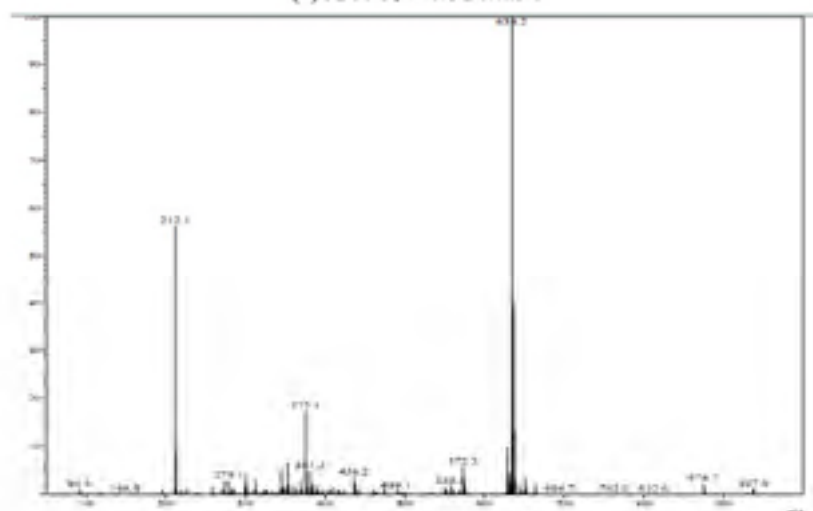
图 5-4 化合物 3 的核磁图

Fig. 5-4 NMR of compound 3

根据图 5-4, 对化合物 3 的核磁分析如下: $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 2.66-2.71(2H, t, COCH_2), 2.94-2.99 (2H, t, phCH_2CH_2), 5.12(2H, s, phCH_2O), 6.92-7.59(13H, m, ArH), 9.95(1H, s, CHO)。初步说明化合物 3 制备成功。



(a) 化合物 6 的核磁图



(b) 化合物 6 的质谱图

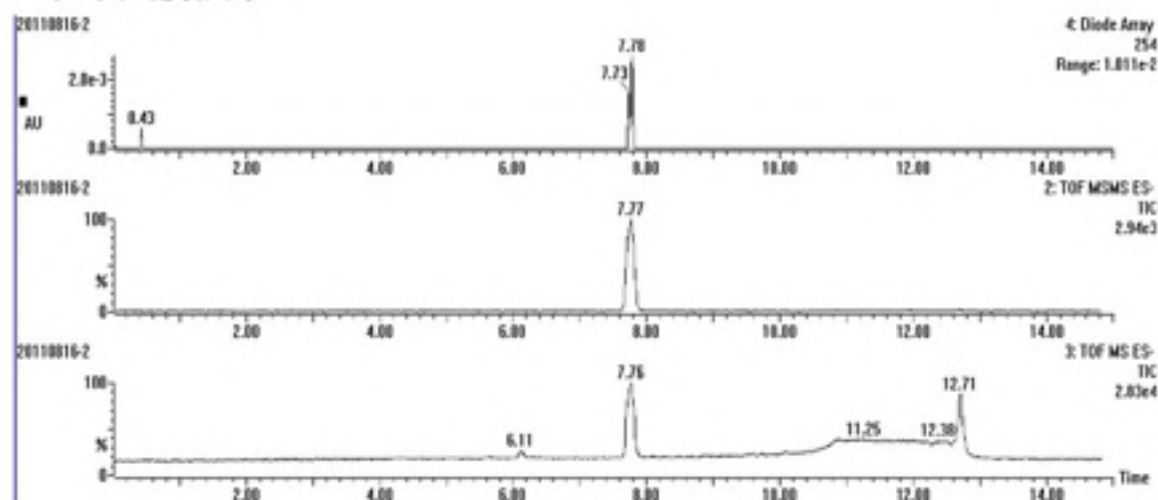
图 5-5 化合物 6 的核磁图和质谱图(b)

Fig. 5-5 NMR spectrum(a) and MS spectrum (b) of compound 6

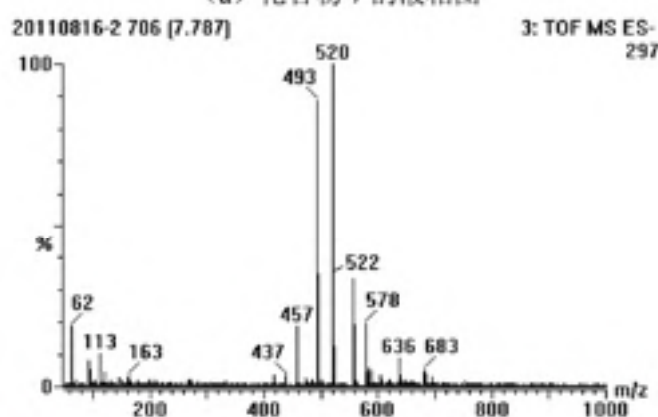
根据图 5-5 (a), 对化合物 6 的核磁结果分析如下: $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.21-1.40(6H, s, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 2.01-2.06(1H, d, CHCO), 2.22-2.28(1H, t, =CHCH), 2.66-2.71(2H, t, CH_2CO), 2.93-2.98(2H, t, phCH_2), 5.11(2H, t, phCH_2O) 6.31(1H, s, CNCH), 6.81-7.42(13H, m, ArH)。由图 5-5 (b) 可见, MS 图中的分子离子峰是 634.2, 结合化合物 6 的分子量 611, 说明该分子离子峰是由分子和 Na^+ 结合产生的。综上可得, 化合物 6 合成成功, 再加上核磁谱中的杂峰很少, 说明其纯度很高。

从图 5-6 (a) 中可以看出, 明显的出峰只有 1 个, 说明样品中只含有 1 种主要组分, 因为半抗原具有旋光异构单体, 所以色谱峰有分叉现象。由图 5-6 (b) 可以看出, 该峰对应的分子离子峰是 520, 采用了负离子模式, 加上化合物 7 的分子量为 521, 说明分子离子峰是分子本身的失去了 H^- 产生的。初步说明合成了化合物 7。结合图 5-6 (c) 分析化合物 7, 结果如下: $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.21-1.40(6H, s, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 2.01-2.06(1H, d, CHCO), 2.22-2.28(1H, t, =CHCH), 2.66-2.71(2H, t, CH_2CO), 2.93-2.98 (2H, t, phCH_2), 5.11(2H, t, phCH_2O) 6.31(1H, s, CNCH), 6.81-7.42(13H, m, ArH)。说明成功合成了化合物

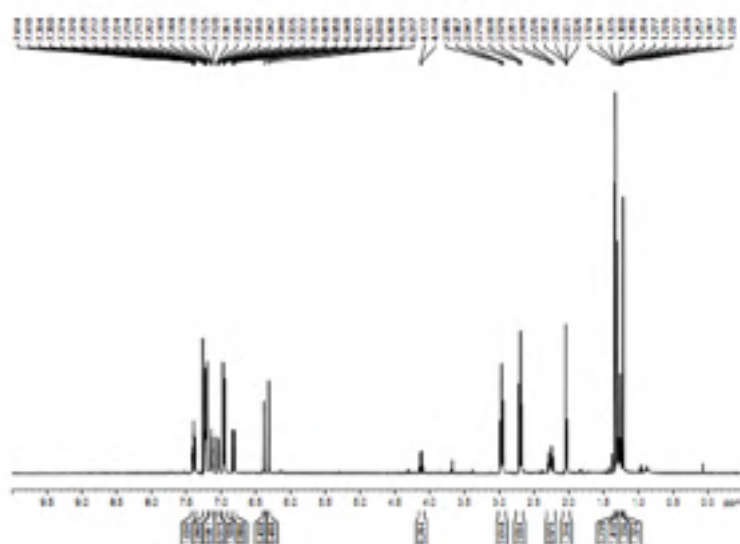
7, 而且其纯度很高。



(a) 化合物 7 的液相图



(b) 化合物 7 的质谱图



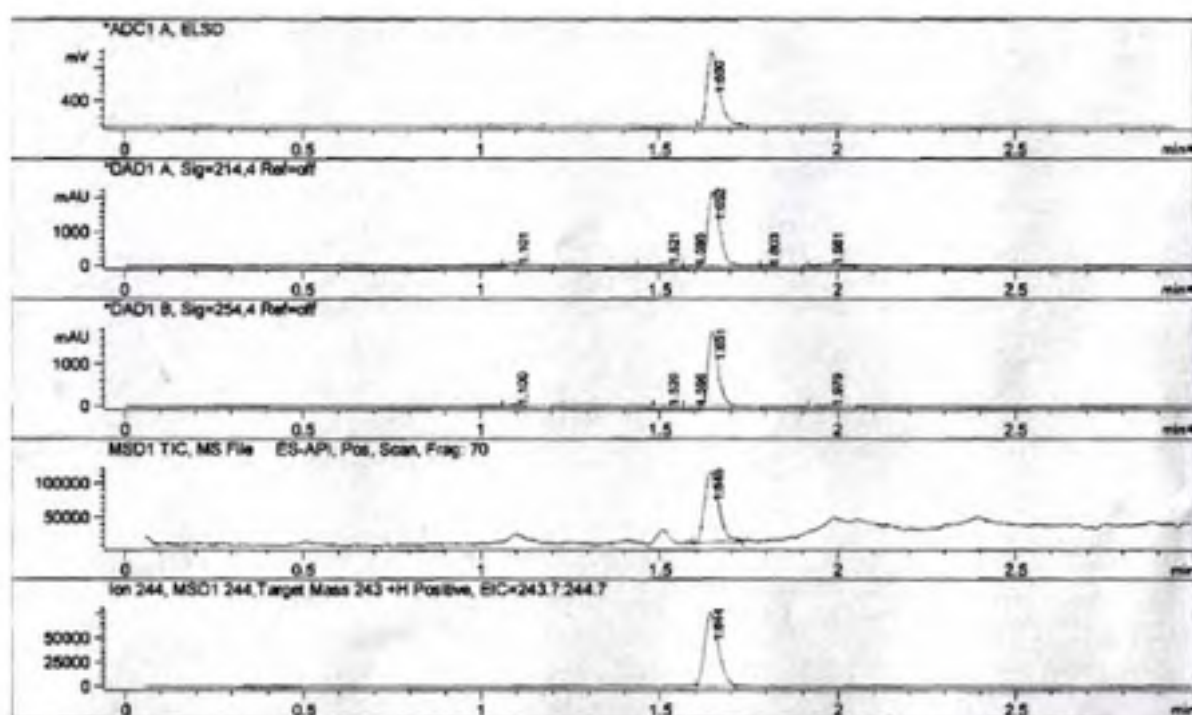
(c) 化合物 7 的核磁图

图 5-6 化合物 7 的色谱图 (a)、质谱图 (b) 和核磁图 (c)

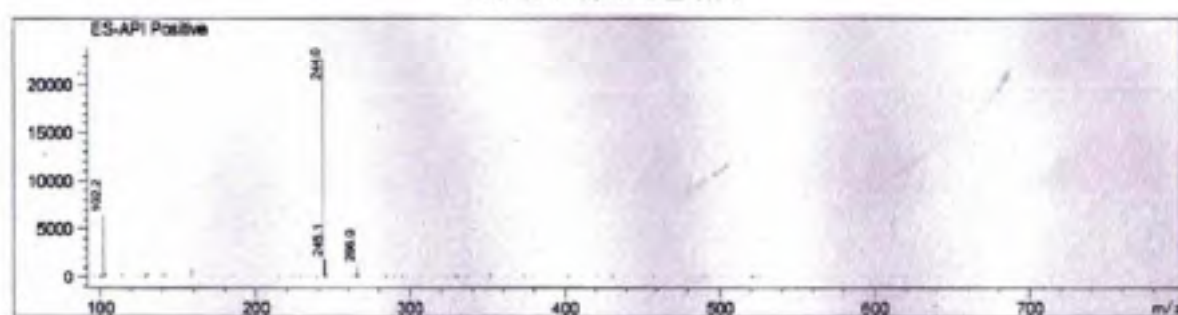
Fig. 5-6 LC spectrum (a), MS spectrum (b) and NMR spectrum (c) of compound 7

综上所述, 本方法成功地合成了功夫菊酯的半抗原 1 (H1), 合成步骤安全、有效, 为建立功夫菊酯的酶联免疫分析方法提供了基础。

5.4.1.2 半抗原 2 (H2) 合成中间产物和终产物的鉴定图谱



(a) 化合物 8 的色谱图



(b) 化合物 8 的质谱图

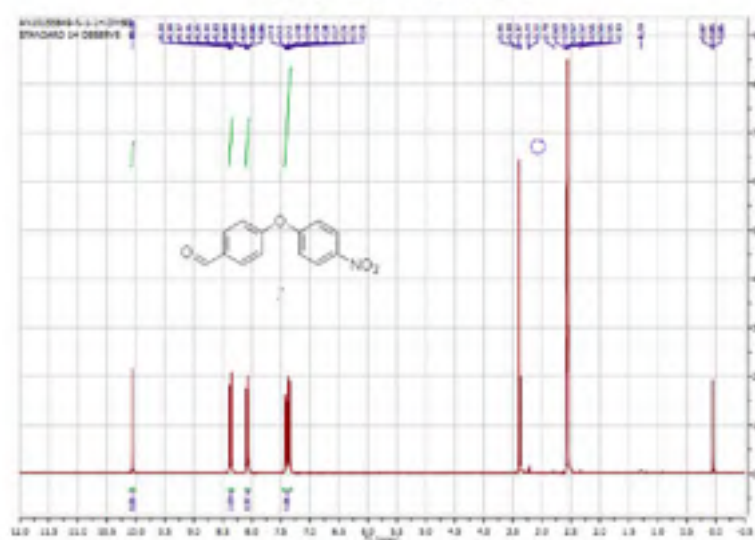


图 5-7 化合物 8 的色谱图 (a)、质谱图 (b) 和核磁图 (c)

Fig. 5-7 LC spectrum (a), MS spectrum (b) and NMR spectrum (c) of compound 8

从图 5-7 (a) 中可以看出, 样品只在 1.65min 出了一个峰, 说明样品中只含有一个组分。由图 5-7 (b) 可以看出, 该峰对应的分子离子峰是 244, 采用了阳离子模式, 而

化合物 8 的分子量为 243。由此可见，该分子离子峰是由分子结合 H^+ 产生的。结合图 5-7 (c) 图，分析化合物的结果如下： 1H NMR (DMSO- d_6 , 300MHz): δ 10.06 (s, 1H), 8.37 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.43~7.33 (m, 4H)，说明成功合成了化合物 8，而且其纯度很高。

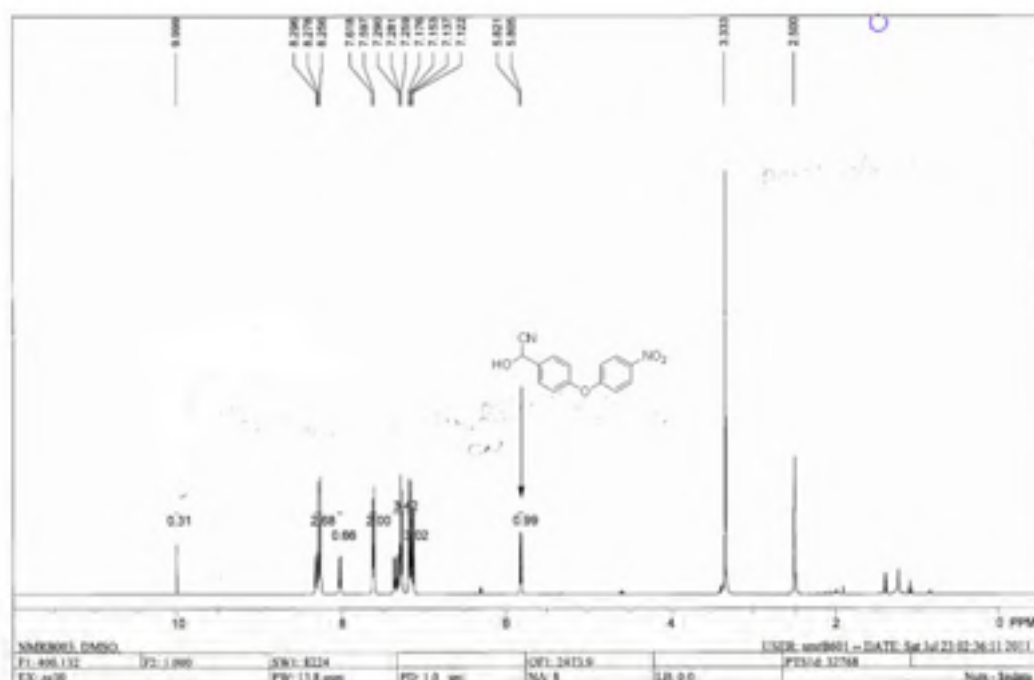
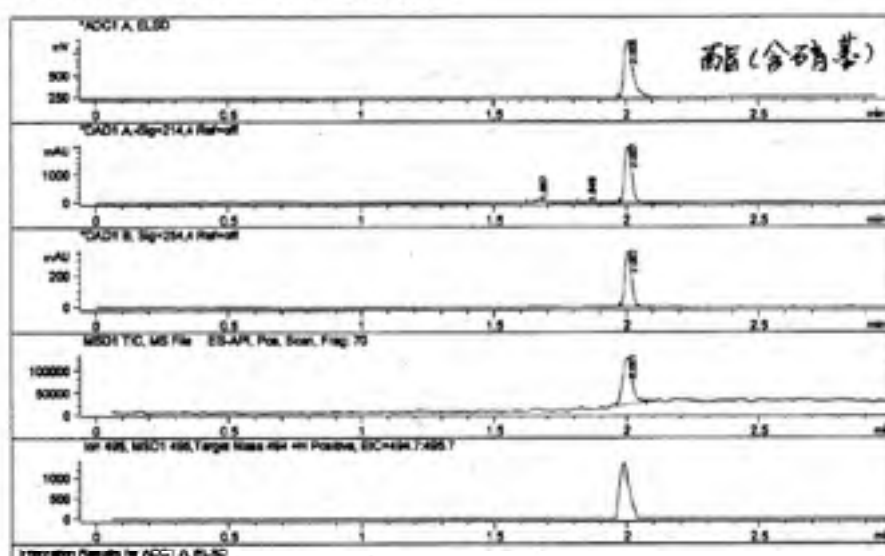


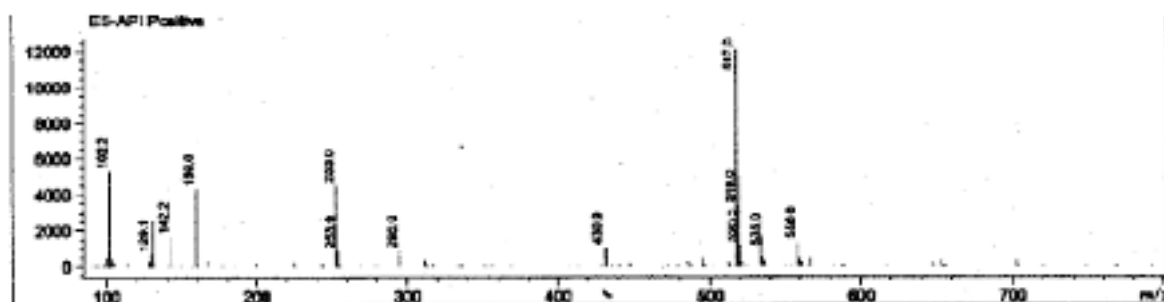
图 5-8 化合物 9 的核磁图

Fig. 5-8 NMR of compound 9

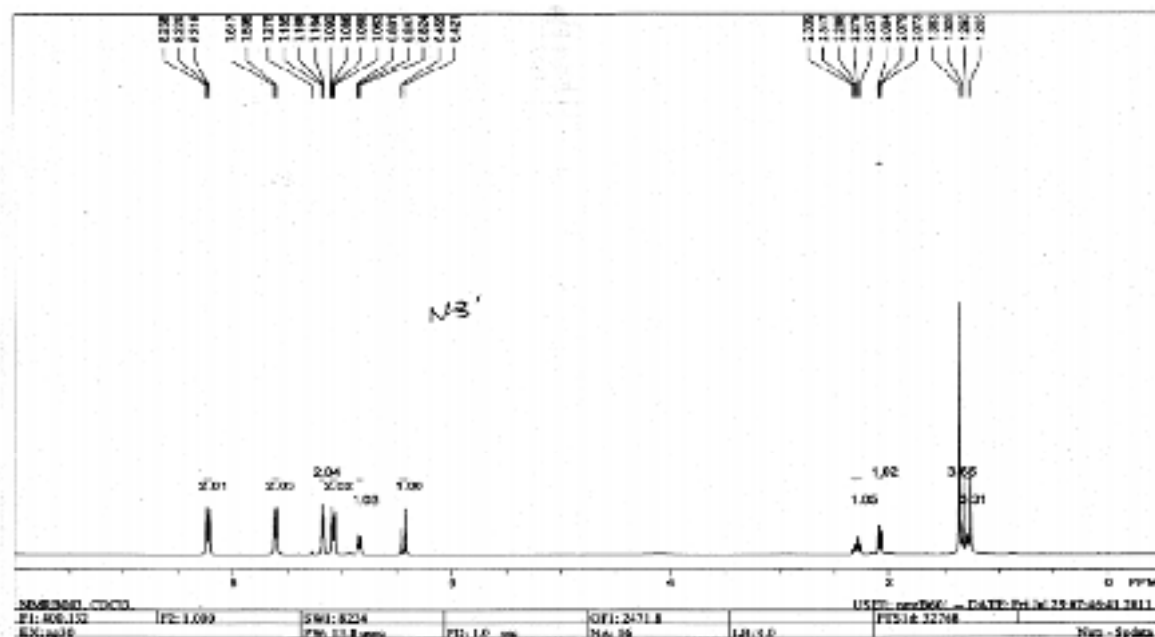
根据图 5-8，分析样品的核磁结果如下： 1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz): δ 8.27 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.27 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 5.81 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H)。从图中表示的位置看，核磁图在 5.5-6.0 min 之间出现单峰 0.99，代表了醇羟基上的氢原子，说明合成了化合物 9。



(a) 化合物 10 的色谱图



(b) 化合物 10 的质谱图



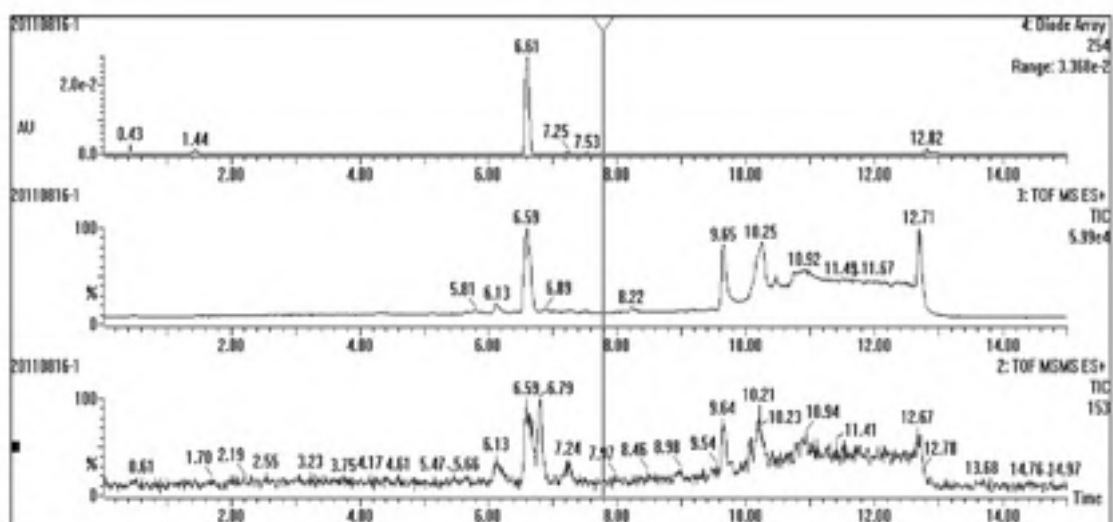
(c) 化合物 10 核磁图

图 5-9 化合物 10 的色谱图 (a)、质谱图 (b) 和核磁图 (c)

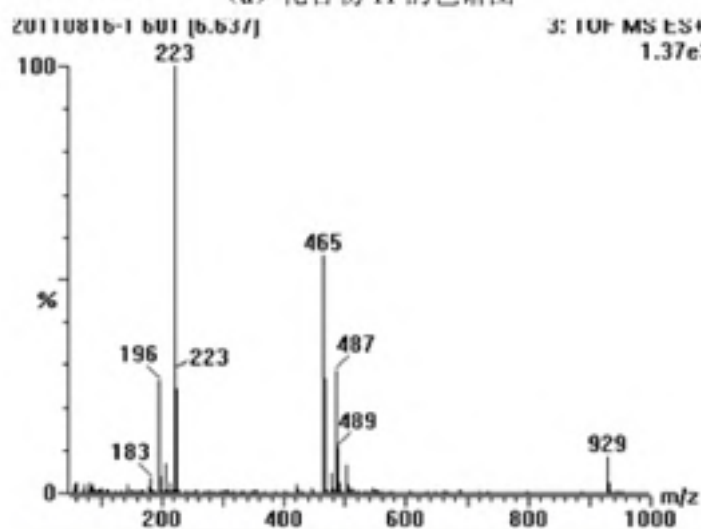
Fig. 5-9 LC spectrum (a), MS spectrum (b) and NMR spectrum (c) of compound 10

从图 5-9 (a) 中可以看出, 样品只在 2.0 min 出了一个峰, 说明样品中只含有一种组分。由图 5-9 (b) 可以看出, 该峰对应的分子离子峰是 517, 采用了阳离子模式, 是由分子结合上 Na^+ 造成的。从图 5-9 (c) 中, 分析化合物的核磁结果如下: ^1H NMR Spectrum (CDCl_3 , 400MHz): δ 8.22 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.85 (m, 1H), 6.43 (d, $J = 13.6$ Hz, 1H), 2.34-2.26 (m, 1H), 2.08 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 1.36-1.27 (m, 6H)。说明成功制备了化合物 10, 而且其纯度很高。

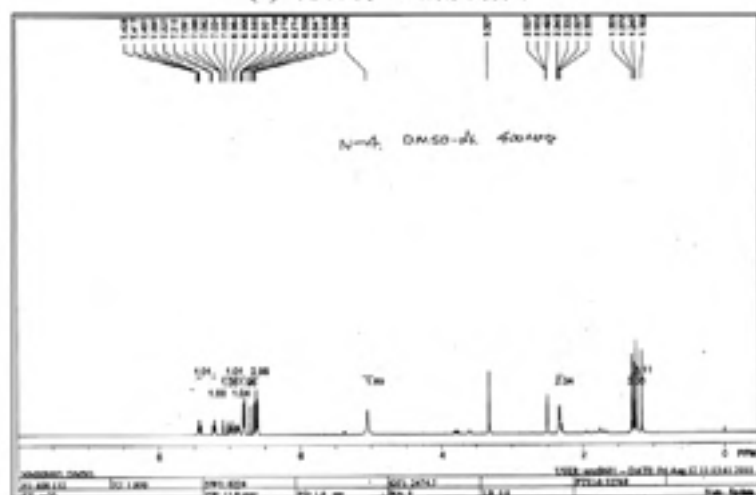
从图 5-10 (a) 中可以看出, 样品只在 6.59 min 出了一个峰。说明样品的主要组分只有 1 种。由图 5-10 (b) 可以看出, 该峰对应的分子离子峰是 465, 采用了阳离子模式, 化合物 11 的分子量为 464, 该分子结合上 H^+ 产生了相应的分子离子峰。根据图 5-10 (c), 分析化合物的核磁结果如下: ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.22-1.39 [6H, t, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$], 2.01-2.05 (1H, d, COCH), 2.21-2.27 (1H, t, d, CHCH), 3.60 (2H, s, b, NH_2), 6.28-6.35 (1H, d, CNCH), 6.68-6.70 (1H, d, dCH), 6.70-7.37 (8H, m, ArH)。根据上述结果, 得出制备的化合物 11 纯度很高。



(a) 化合物 11 的色谱图



(b) 化合物 11 的质谱图



(c) 化合物 11 的核磁图

图 5-10 化合物 11 的色谱图 (a)、质谱图(b) 和核磁图 (c)

Fig. 5-10 LC spectrum (a), MS spectrum (b) and NMR spectrum (c) of compound 11

5.4.2 抗原的合成和鉴定

5.4.2.1 免疫原的合成

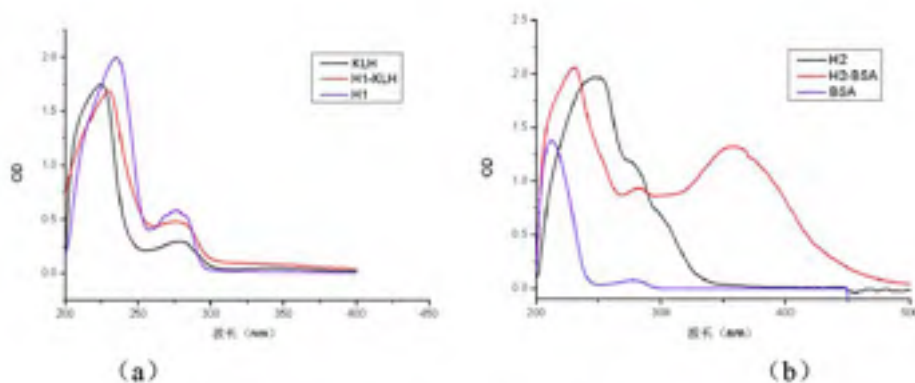


图 5-11 H1-KLH (a) 和 H2-BSA (b) 的紫外图
Fig.5-11 Ultraviolet spectrums of H1-KLH (a) and H2-BSA(b)

由图 5-11 (b) 可见, 半抗原 2 的紫外吸收峰在 245 nm 左右, 而载体蛋白 BSA 的紫外吸收峰在 210 nm 和 280 nm。因为重氮法会生成黄色物质, 在 340 nm 产生明显的新峰。同时在 225 nm 处有明显的偏移, 说明偶联物制备成功。

5.4.2.2 包被原的合成

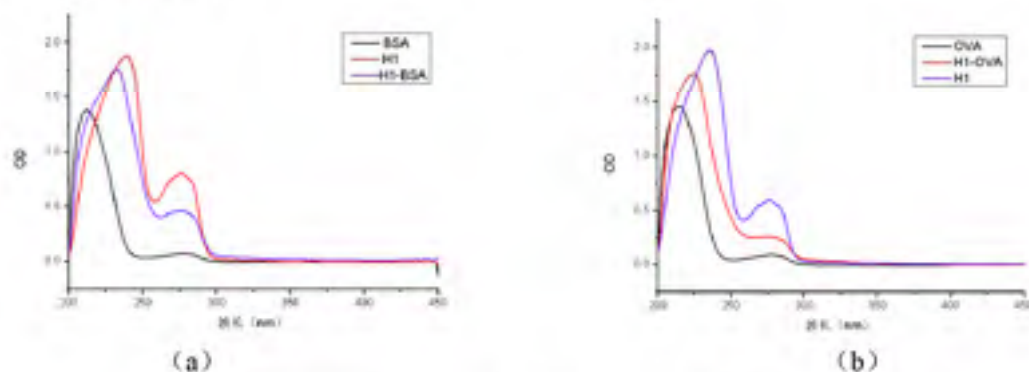


图 5-12 H1-BSA (a) 和 H1-OVA (b) 的紫外图
Fig.5-12 Ultraviolet spectrums of coating antigens H1-BSA (a) and H1-OVA (b)

由图 5-12 可见, 半抗原 1 的紫外吸收峰在 230 nm 和 277 nm 左右, 而载体蛋白 BSA 和 OVA 的紫外吸收峰在 210 nm 和 280 nm 左右。根据偶联物的紫外图在 230 nm 有明显偏移, 并在 280 nm 紫外吸收值明显增大, 说明偶联反应成功。

由图 5-13 可见, 半抗原 2 的紫外吸收峰在 245 nm 左右, 而载体蛋白 OVA 的紫外吸收峰在 210 nm 和 280 nm。因为重氮法会生成黄色物质, 偶联物在 340 nm 产生明显的新峰, 同时在 225 nm 处有明显的偏移, 说明偶联物制备成功。

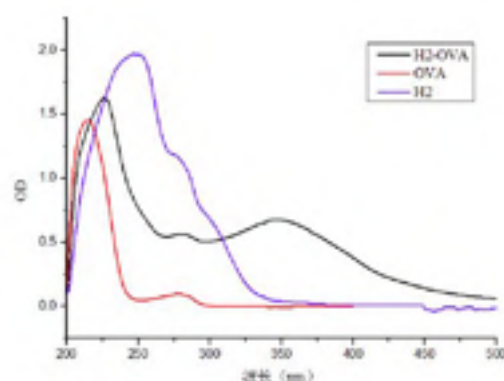


图 5-13 包被原 H2-OVA 的紫外图

Fig.5-13 Ultraviolet spectrum of coating antigen H2-OVA

5.4.3 抗血清的筛选

表 5-2 不同血清的测定结果

Table 5-2 Results of different antiserum

免疫原	血清 编号	包被原							
		H1-BSA		H1-OVA		H2-BSA		H2-OVA	
		效价	IC ₅₀	效价	IC ₅₀	效价	IC ₅₀	效价	IC ₅₀
H1- KLH	11	+++	385	+++	307	+++	255	+	231
	12	+++	340	+++	259	++	208	+	179
	13	+++	236	++++	198	+++	212	+	164
	14	+++	468	+++	507	+++	355	+	331
	15	+++	570	+++	659	++	438	+	379
	16	+++	336	++++	287	+++	252	+	234
H2- BSA	21	+	323	+	275	-	-	+	442
	22	+	273	+	246	-	-	+	302
	23	+	291	+	341	-	-	+	327
	24	+	324	+	294	-	-	+	432
	25	+	664	+	524	-	-	+	893
	26	+	481	+	421	-	-	+	564

说明：包被原的浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；抗体的浓度为 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；(+++)代表吸光值大于 2.0；(+++)代表吸光值在 1.5-2.0；(++)代表吸光值在 1.0-1.5；(+)代表吸光值在 <1.0；(-)表示该包被原不适合测定相应的血清。

由表 5-2 可得，由半抗原 1 合成免疫原免疫小鼠血清的效价普遍较高，可能因为 H2 半抗原采用重氮化法合成免疫原时，有沉淀生成，降低了偶联效率。也可能因为 H1 偶联的载体蛋白是 KLH，用作载体蛋白对小鼠的免疫刺激比较大造成的。同时，同源包被测定的效价普遍比异源高，说明同源包被的亲合力更好。不过，异源包被测定血清的抑制相对较好。因为当包被原的效价降低时，相对而言，增大标准品和抗体的结合能力，所以抑制比较好。不过，并不是所有的异源包被都能提高 ELISA 的灵敏，主要和半抗原的种类有关。根据表 5-2 还可得，由免疫原 H2-KLH 免疫 13 号小鼠的效价高 (OD>2.0)，并且 IC₅₀ 最低，为 164 ng/mL，所以，选择 13 号小鼠进行融合。

5.4.4 单克隆抗体的特性

5.4.4.1 细胞株和包被原的组合筛选

表 5-3 三株细胞对四种包被原的效价和 IC_{50} 的测定

Table 5-3 Titre and IC_{50} of three cell lines and four antigens

包被原 ($1\mu\text{g/mL}$)	细胞编号	腹水稀释倍数	IC_{50} (ng/mL)
H1-B	1B10	1:1000	>200
	2C8	1:64000	58.9
	2D9	1:32000	77.0
H1-O	1B10	1:1000	81.6
	2C8	1:64000	44.4
	2D9	1:32000	62.1
H2-B	1B10	1:1000	>200
	2C8	1:32000	36.4
	2D9	1:15000	45.4
H2-O	1B10	1:1000	41.7
	2C8	1:32000	33.4
	2D9	1:15000	37.3

由表 5-3 可见,同源包被原比异源包被原的亲合力明显要好,但异源包被的灵敏度更好。抗体 2C8 对包被原 H2-O 的亲合力高并抑制好。因此,选择细胞株 2C8 和包被原 H2-O 进行抗体特性的测定。同时选出抗体 2C8 和包被原 H2-O 的最适浓度分别为 $0.5\mu\text{g/mL}$ 和 $0.04\mu\text{g/mL}$ 。

5.4.4.2 单克隆抗体亲和力测定

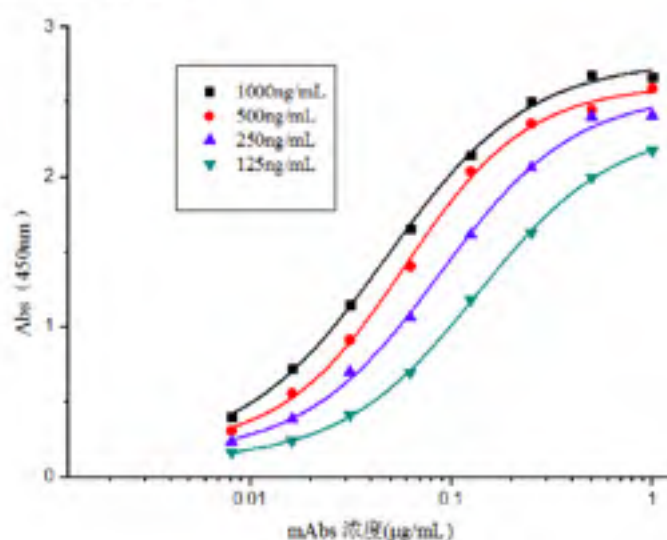


图 5-14 抗体 2C8 亲和常数的测定

Fig.5-14 Affinity constant result of antibody 2C8

由图 5-14 的回归方程,计算出 OD_{max} 抑制一半时对应的抗体浓度,分别为 $0.04\mu\text{g/mL}$, $0.052\mu\text{g/mL}$, $0.072\mu\text{g/mL}$, $0.11\mu\text{g/mL}$, 再将抗体浓度的单位转化为 mol/L , 根据 2.9.3 的公式,计算出抗体的亲和常数为 $2.8 \times 10^6 \text{ L/mol}$ 。

5.4.4.3 单克隆抗体亚型鉴定

采用 IsoQuick™ 对鼠源性 mAbs 的亚型的鉴定结果如图 5-16。



图 5-15 mAb 亚型的鉴定结果

Fig.5-15 identification result of mAb isotype

由图 5-15 可见,和右侧标准图相比,抗体的重链和轻链亚型分别为为 IgG_{2b} 和 Kappa。

5.4.5 ELISA 方法的条件优化

根据 5-16(a), PVP 和酪蛋白酸钠对应 A_{max} 的比较小。而 BSA 和 OVA 作为封闭剂测定时,背景稍微高一些,所以 IC₅₀ 也随着增大。因此,选择 0.2%明胶进行下一步试验。

由 5-16 (b)可见,抗体对偏酸 (pH 5.2) 或者偏碱 (pH 8.0) 的环境比较敏感,试验 pH 在 6.0-7.2 之间,对 ELISA 的结果没有明显的影响。本试验选择 pH 7.2 进行下一步的优化。

由 5-16(c)可见,当标准品稀释液中甲醇含量 10-40%之间变化时, A_{max} 变化在 0.97-1.28 之间。IC₅₀ 的变化是先减小,后增大。当甲醇含量为 20%时, A_{max} 最大,且 IC₅₀ 最小为 27.8 ng/mL。故选择 20%甲醇进行下一步优化。

由 5-16 (d)可见,随着抗体稀释液中离子强度 (NaCl 含量) 的增大, A_{max} 变化不大。但当缓冲溶液中 NaCl 含量超过 1%, A_{max} 开始下降。说明离子强度过大,影响抗原和抗体的结合。当抗体稀释液中 NaCl 含量为 0.8%, IC₅₀ 值最小,为 15.8 ng/mL。因此,选择 0.8% NaCl 为最适条件。

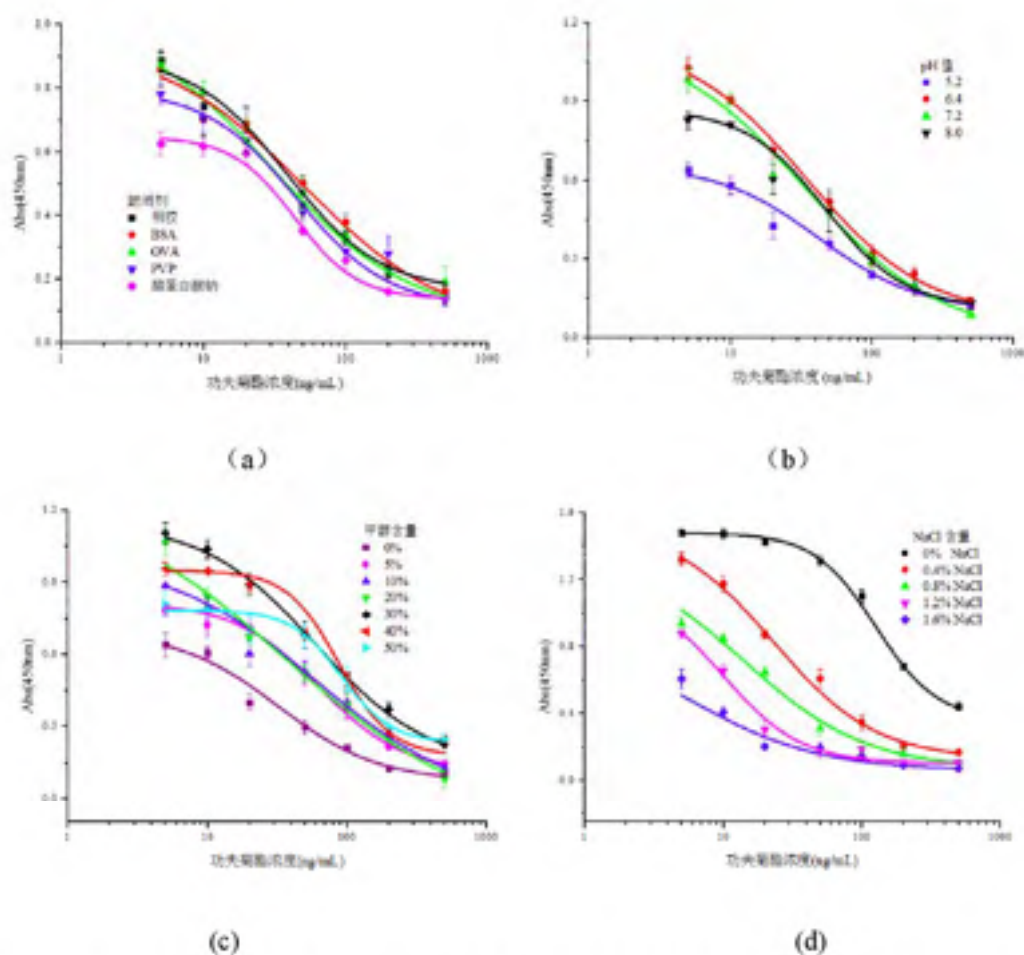


图 5-16 封闭剂 (a)、pH (b)、甲醇含量 (c) 和离子强度 (d) 对 ELISA 方法的影响
 Fig. 5-16 Effects of blocking agents (a), pH value (b), methanol content (c), ionic strength (d) in assay buffer on performance of ELISA

5.4.6 灵敏度的测定

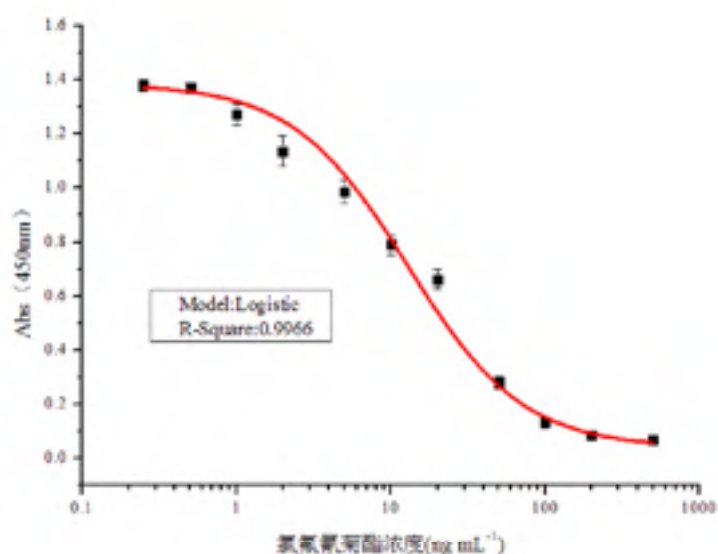


图 5-17 氯氟氰菊酯标品的抑制曲线
 Fig. 5-17 Inhibition curves for cyhalothrin analysis with ELISA

图 5-17 曲线中的点是 18 次重复试验的平均值。根据图 5-17 拟合的曲线方程, 计算出氯氟氰菊酯的 IC_{50} 为 13.26 ± 1.23 ng/mL, 检测限为 1.83 ng/mL。

5.4.7 交叉反应的测定

表 5-4 单克隆抗体交叉反应的结果
Table 5-4 Cross-reactivity results of mAb

菊酯名称	$IC_{50} \pm CV$ (ng/mL) (n=6)	交叉反应率 (%)
氯氟氰菊酯	13.62 ± 1.23	100
半抗原 1	179.4 ± 12.66	7.59
半抗原 2	94.9 ± 10.35	14.35
氰胺氰菊酯	279.4 ± 24.85	4.87
苯醚氰菊酯	2841.7 ± 186.05	0.48

由表 5-4 可得, 单克隆抗体只和氰胺氰菊酯和苯醚氰菊酯有低于 5% 的交叉, 和其他类似物如功夫酸、氟氯氰菊酯、氟氰戊菊酯和氯氟菊酯没有交叉反应, 说明该抗体对氯氟氰菊酯具有很好的特异性。

5.4.8 添加回收试验

通过添加回收试验, 评估建立的 ELISA 方法用于水样的有效性; 根据图 5-17 的标准曲线的回归方程, 计算表 5-5 中的添加回收率; 结果见表 5-5

由表 5-5 可得, 三种水样 (河水、自来水和饮用水) 的回收率均高于 75%, 日内的变异系数在 5.1-7.9% 及日间的变异系数在 7.8-11.6%。三种水样相比, 由于湖水的成分相对比较复杂, 所以回收率相对低些 (75.4-87.3%)。

表 5-5 水样中氯氟氰菊酯的添加回收实验
Table 5-5 Results of recovery test for cyhalothrin in water sample

水样	添加水平 ($\mu\text{g/mL}$)	平均回收率 (%)	变异系数 (%)	
			日内 (n=6)	日间 (n=3)
饮用水	0.2	97.7 ± 3.3	5.4	7.8
	1	94.5 ± 3.7	5.1	8.6
	5	84.7 ± 2.8	7.2	9.5
自来水	0.2	94.6 ± 4.2	5.6	8.4
	1	86.5 ± 3.7	6.5	10.5
	5	80.6 ± 2.5	7.6	9.7
河水	0.2	87.3 ± 3.4	6.5	10.3
	1	81.8 ± 2.8	7.2	8.9
	5	75.4 ± 1.6	7.9	11.6

5.5 本章小结

1. 比较免疫原 H1-KLH 和 H2-BSA 产生血清的效价和抑制, 选择 H1-KLH 免疫的 13 号小鼠进行融合。

2.采用常规的细胞融合技术,筛选了3株单克隆细胞株(1B10,2C8,3D9)。通过体内诱生法产生腹水,经辛酸-硫酸铵沉淀法纯化后,得到抗氯氟氰菊酯的单克隆抗体。

3.试验选择单克隆抗体 2C8 和 H2-O 包被原组合进行后续试验,并确定包被原 H2-OVA 浓度:0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 2C8 腹水的蛋白浓度 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

4.细胞 2C8 腹水的亲和常数为 $2.8 \times 10^6 \text{ L}/\text{mol}$ 。抗体的重链和轻链的类型分别为 IgG_{2b} 和 kappa 链。

5.Ic-ELISA 优化后的条件为封闭液:0.05M CB (pH 9.6) + 0.2% 明胶;抗体稀释液 (0.01M PB, pH 7.2, 0.8% NaCl+0.1%明胶+0.05% Tween20);标准品稀释液 (0.01M PBS, 20% 甲醇)。

6.在最适条件下,测定氯氟氰菊酯的 IC_{50} $13.26 \pm 1.23 \text{ ng}/\text{mL}$,检测限为 1.83 ng/mL 。单克隆抗体只对氯胺氰菊酯和苯醚氰菊酯有低于 5%的交叉反应,与其他类似物没有交叉反应,说明单克隆抗体对氯氟氰菊酯具有很好的特异性。二种水样(河水、自来水)的添加回收率均高于 75%,日内和日间的变异系数分别在 5.1-7.9%及 7.8-11.6%。说明建立 ELISA 方法可以用于水样中氯氟氰菊酯的检测。

主要结论

1. 拟除虫菊酯群选择性单克隆抗体的制备及其酶联免疫检测方法的建立

根据 II 型拟除虫菊酯结构的三个共同部分（菊酸、 α -氰基和苯环部分），结合计算机软件（Discovery Studio 2.5 和 Gaussian 04）辅助设计菊酯的群选择性半抗原，最终选择半抗原 1 和血蓝蛋白（或牛血清白蛋白）偶联物作为免疫原，通过免疫、融合和筛选，获得了拟除虫菊酯群选择性的单克隆抗体。

Ic-ELISA 方法的最适条件：包被原 H5-BSA 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；单克隆抗体浓度为 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；缓冲液中 NaCl 含量 1%，pH 7.2，甲醇含量 20%。在此条件下，抗体和氯氟菊酯、甲氰菊酯、顺氰戊菊酯、联苯菊酯、溴氰菊酯和氰戊菊酯的交叉反应较高，说明本试验获得了拟除虫菊酯的群选择性单克隆抗体。

2. 制备了拟除虫菊酯多残留检测的金标试纸条

金标记抗体最适条件：每毫升的金纳米溶液需要添加 0.1 mol/L K_2CO_3 3 μL 及抗体用量 5-10 μg ；包被原 H5-B 浓度 0.5 mg/mL。制备的试纸条借助便携式读卡器对氯氟菊酯的检测限达到了 12.86 ng/mL；同时对氯氟菊酯、甲氰菊酯和顺氰戊菊酯的肉眼检测限分别达到了 60 ng/mL、200 ng/mL 和 400 ng/mL，灵敏度达到了果蔬中菊酯多残的检测要求。

3. 氯氟菊酯单体、氰戊菊酯单体和甲氰菊酯单体的制备及菊酯群选择性抗体立体选择性的研究

在优化条件下，利用 HP-硅胶柱和 Sino-Chiral OD 手性柱通过 2 次分离制备了 8 个氯氟菊酯单体、4 个氰戊菊酯单体和 2 个甲氰菊酯单体。同时，利用 Sino-Chiral OD 手性柱并结合文献，确定了每种单体的构型和纯度。

通过测定拟除虫菊酯群选择性单克隆抗体对 8 个氯氟菊酯单体、4 个氰戊菊酯单体和 2 个甲氰菊酯单体的交叉反应，结果表明，菊酯群选择性单克隆抗体更倾向于识别菊酯分子中 α 碳原子的 S 构型和环丙烷的顺式构型。

4. 构建了拟除虫菊酯群选择性单克隆抗体的三种定量构效模型

试验从分子整体水平、亚结构水平和空间水平来分析小分子结构描述符和抗体活性之间的相关性。由 2D-QSAR 模型得出，抗体的识别能力和菊酯的疏水性大小、氢受体的个数有关。而且菊酯的疏水性越小，抗体的识别能力可能会越好。HQSAR 模型主要研究分子特定片段对抗体活性的贡献。由 HQSAR 模型得出，分子中化学键的类型、连接数和化合物的手性和抗体活性有很大的相关性。根据 HQASR 分析分子片段的指纹图谱可得，半抗原中和载体蛋白相连的部分，尽管在免疫反应中暴露比较少，但对于抗体识别能力有明显的影 响。Topomer QSAR 模型先把分子切割成片段，分析分子特定片段（R2）空间场和静电场的等高势对抗体活性变化的影响，建立的模型可用于探索抗原抗体的作用机理。

5. 制备了氯氟菊酯的特异性单克隆抗体

试验设计并合成了针对氯氟菊酯的 2 种特异性半抗原，采用快速佐剂免疫，不需

要繁琐的乳化，简单混匀即可免疫，并且能够减少免疫原的浪费，通过融合和筛选，获得产生氯氟氰菊酯单克隆抗体的三株细胞（1B10, 2C8, 3D9）。通过测定三株细胞腹水的效价和抑制，选择 2C8 细胞纯化腹水进行优化试验。

6. 建立了氯氟氰菊酯高灵敏的酶联免疫检测方法

Ic-ELISA 优化后的条件：包被原 H2-OVA 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；2C8 腹水的蛋白浓度 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；封闭液 0.05M CB (pH 9.6)+0.2% 明胶；抗体稀释液 (0.01M PB, pH 7.2 +0.8% NaCl+0.1% 明胶+0.05%Tween20)；标准品稀释液 (0.01M PBS, 20% 甲醇)。在最适条件下，测定抗体对氯氟氰菊酯的灵敏度和特异性，方法的检测限达到 1.83 ng/mL，为目前检测氯氟氰菊酯最灵敏的抗体。交叉试验表明，单克隆抗体对氯氟氰菊酯具有很好的特异性。同时对三种水样（河水、自来水和饮用水）的平均回收率在 75.4%-97.7%之间，变异系数小于 15%，说明建立的 ic-ELISA 方法可以用于水样中氯氟氰菊酯的检测。

论文创新点

1. 制备了检测拟除虫菊酯多残留的金标试纸条。
2. 构建了拟除虫菊酯群选择性单克隆抗体的 2D-QSAR, HQSAR 和 Topomer QSAR 模型。
3. 建立了高灵敏地检测氟氟菊酯的酶联免疫法, 检测限达到了 1.83 ng/mL。

致 谢

本论文是在我的导师胥传来教授的悉心指导下完成的，首先感谢胥老师为我提供了在江南大学继续深造的机会。胥老师学术思维开阔、兢兢业业，严格要求学生以及实验室浓厚的学术氛围给我留下了深刻的印象，也是我今后工作学习的楷模。此外，还在潜移默化中使我明白了很多为人处世的道理，总之，本人能够在三年内完成博士论文，和胥老师的帮助和支持是分不开的，因此，再次向胥老师表示最真诚的感谢。

同时，特别感谢实验室的匡华老师，宋如娜老师，彭池方老师，徐丽广老师和胡拥明老师在本论文完成过程中的提供的无私帮助和热忱鼓励。

同时衷心感谢实验室的刘丽强，张勋，郝昌龙，孙凤霞，邢常瑞，勇倍倍，严慧娟，陈燕妮，马伟，严文静，吴晓玲，邓晓芳等，有你们相伴，使我在欢声笑语中走过三年求学之路，使我心存感动。

最后感谢我的父母、爱人和孩子，你们默默地付出和深深地理解，给我的学习创造了优越的条件，为论文的完成提供了有利的保障，同时也是我刻苦努力的精神源泉，使我在学习的道路上满怀信心、乐观向上、勇往直前。

回首过去的江大三年，期间有开心的笑声；也有委屈的泪水；有锲而不舍的坚持着；也有茫然的彷徨着；有成功的喜悦；也曾受失败的折磨，每一段经历都是我人生的宝贵财富。同时三年的研究生活，使我收获颇多，将使我在今后的工作中能够开创一个新局面。

最后，向所有帮助过我的老师、亲人、同学、朋友们表示最诚挚的谢意。

参考文献

1. Matsuo T, Itaya N, Mizutani T, et al. 3-Phenoxy-alpha-cyano-benzyl esters, the most potent synthetic pyrethroids. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1976, 40: 247-249
2. Katsuda Y. Development of and future prospects for pyrethroid chemistry. *Pesticide Science*, 1999, 55 (8): 775-782
3. Elliott M, Farnham A, James N, et al. Synthetic insecticide with a new order of activity. *Nature*, 1974, 248: 710-711
4. Elliott M, Farnham A, James N, et al. A photostable pyrethroid. 1973, 246: 169-170
5. Ohno N, Fujimoto K, Okuno Y, et al. A new class of pyrethroidal insecticides alpha-substituted phenylacetic acid esters. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1974, 38:881-883
6. Chen Z-M, Wang Y-H. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 1996, 754 (1): 367-395
7. Tan B, Luo G, Qi X, et al. Enantioselective extraction of d-l-tryptophan by a new chiral selector: Complex formation with di (2-ethylhexyl) phosphoric acid and O, O'-dibenzoyl-(2R, 3R)-tartaric acid. *Separation and Purification Technology*, 2006, 49 (2): 186-191
8. Hunter W, Yang Y, Reichenberg T, et al. Measuring pyrethroids in sediment pore water using matrix-solid phase microextraction. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 28 (1): 36-43
9. Haya K. Toxicity of pyrethroid insecticides to fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1989, 8 (5): 381-391
10. Wang W, Cai D, Shan Z, et al. Comparison of the acute toxicity for gamma-cyhalothrin and lambda-cyhalothrin to zebra fish and shrimp. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2007, 47 (2): 184-188
11. Godin S J, Crow J A, Scollon F J, et al. Identification of rat and human cytochrome P450 isoforms and a rat serum esterase that metabolize the pyrethroid insecticides deltamethrin and esfenvalerate. *Drug Metabolism and Disposition*, 2007, 35 (9): 1664-1671
12. Kao L, Motoyama N, Dauterman W. Multiple forms of esterases in mouse, rat, and rabbit liver, and their role in hydrolysis of organophosphorus and pyrethroid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1985, 23 (1): 66-73
13. Suzuki T, Miyamoto J. Purification and properties of pyrethroid carboxylesterase in rat liver microsome. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1978, 8 (2): 186-198
14. Ross M K, Borazjani A, Edwards C C, et al. Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. *Biochemical Pharmacology*, 2006, 71 (5): 657-669
15. De Welle J R, Brown L D, Narahashi T. Pyrethroid modifications of the activation and inactivation kinetics of the sodium channels in squid giant axons. *Brain Research*, 1990, 512 (1): 26-32
16. Narahashi T. Nerve membrane ion channels as the target site of insecticides. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2002, 2 (4): 419-432
17. Forshaw P, Lister T, Ray D. The role of voltage-gated chloride channels in type II pyrethroid insecticide poisoning. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000, 163 (1): 1-8
18. Eshleman A J, Murray T. Pyrethroid insecticides indirectly inhibit GABA-dependent ³⁶Cl influx in synaptosomes from the trout brain. *Neuropharmacology*, 1991, 30 (12): 1333-1341
19. Symington S B, Frisbie R K, La K D, et al. Action of cismethrin and deltamethrin on functional attributes of isolated presynaptic nerve terminals from rat brain. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2007, 87 (2): 172-181
20. Xiao H, Zhang X C, Zhang L, et al. Fenvalerate modifies T-type Ca²⁺ channels in mouse

- spermatogenic cells. *Reproductive Toxicology*, 2006, 21 (1): 48-53
21. Tian Y T, Liu Z W, Yao Y, et al. Effects of alpha-and theta-cypermethrin insecticide on transient outward potassium current in rat hippocampal CA3 neurons. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2008, 90 (1): 1-7
22. Nasuti C, Gabbianelli R, Falcioni M L, et al. Dopaminergic system modulation, behavioral changes, and oxidative stress after neonatal administration of pyrethroids. *Toxicology*, 2007, 229 (3): 194-205
23. Symington S B, Frisbie R K, Clark J M. Characterization of 11 commercial pyrethroids on the functional attributes of rat brain synaptosomes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2008, 92 (2): 61-69
24. Wang C, Chen F, Zhang Q, et al. Chronic toxicity and cytotoxicity of synthetic pyrethroid insecticide cis-bifenthrin. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21 (12): 1710-1715
25. Luconi M, Bonaccorsi L, Forti G, et al. Effects of estrogenic compounds on human spermatozoa: evidence for interaction with a nongenomic receptor for estrogen on human sperm membrane. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2001, 178 (1): 39-45
26. Al-Sarar A S, Abobakr Y, Bayoumi A E, et al. Reproductive toxicity and histopathological changes induced by lambda-cyhalothrin in male mice. *Environmental Toxicology*, 2012, DOI: 10.1002/tox.21802
27. Farag A T, Goda N F, Shaaban N A, et al. Effects of oral exposure of synthetic pyrethroid, cypermethrin on the behavior of F1-progeny in mice. *Reproductive Toxicology*, 2007, 23 (4): 560-567
28. El-Sayed Y S, Saad T T, El-Bahr S M. Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2007, 24 (3): 212-217
29. Pimpão C T, Zampronio A R, Silva de Assis H C. Exposure of *Ancistrus multispinis* (Regan, 1912, Pisces, Teleostei) to deltamethrin: Effects on cellular immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25 (5): 528-532
30. Righi D, Xavier F, Palermo-Neto J. Effects of type II pyrethroid cyhalothrin on rat innate immunity: a flow cytometric study. *International Immunopharmacology*, 2009, 9 (1): 148-152
31. Liu J, Yang Y, Yang Y, et al. Disrupting effects of bifenthrin on ovulatory gene expression and prostaglandin synthesis in rat ovarian granulosa cells. *Toxicology*, 2011, 282 (1): 47-55
32. Du G, Shen O, Sun H, et al. Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays. *Toxicological Sciences*, 2010, 116 (1): 58-66
33. Deguchi Y, Yamada T, Hirose Y, et al. Mode of action analysis for the synthetic pyrethroid metofluthrin-induced rat liver tumors: evidence for hepatic CYP2B induction and hepatocyte proliferation. *Toxicological Sciences*, 2009, 108 (1): 69-80
34. Rao G V, Jagannatha Rao K S. Modulation in acetylcholinesterase of rat brain by pyrethroids in vivo and an in vitro kinetic study. *Journal of Neurochemistry*, 1995, 65 (5): 2259-2266
35. Rao G V, Rao K J. Inhibition of monoamine oxidase-A of rat brain by pyrethroids—an in vitro kinetic study. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1993, 124 (2): 107-114
36. Kakko I, Toimela T, Tähti H. The synaptosomal membrane bound ATPase as a target for the neurotoxic effects of pyrethroids, permethrin and cypermethrin. *Chemosphere*, 2003, 51 (6): 475-480
37. El-Demerdash F M. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49 (6): 1346-1352
38. Tiwari M N, Singh A K, Ahmad I, et al. Effects of cypermethrin on monoamine transporters, xenobiotic metabolizing enzymes and lipid peroxidation in the rat nigrostriatal system. *Free Radical Research*, 2010, 44 (12): 1416-1424
39. Martínez Galera M, Barranco Martínez D, Parrilla Vázquez P, et al. Online trace enrichment to

- determine pyrethroids in river water by HPLC with column switching and photochemical induced fluorescence detection. *Journal of Separation Science*, 2005, 28 (17): 2259-2267
40. Sharif Z, Man Y B C, Hamid N S A, et al. Determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in fruit and vegetables using solid phase extraction clean-up cartridges. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1127 (1): 254-261
41. Esteve-Turrillas F A, Paster A, Guardia M d I. Determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable oils by using combined solid-phases extraction and tandem mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 553 (1): 50-57
42. Casas V, Llompart M, García-Jares C, et al. Multivariate optimization of the factors influencing the solid-phase microextraction of pyrethroid pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1124 (1-2): 148
43. Vázquez P P, Mughari A R, Galera M M. Solid-phase microextraction (SPME) for the determination of pyrethroids in cucumber and watermelon using liquid chromatography combined with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 607 (1): 74-82
44. Esteve-Turrillas F, Aman C, Paster A, et al. Microwave-assisted extraction of pyrethroid insecticides from soil. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 522 (1): 73-78
45. Rissato S R, Galhiane M S, Apen B M, et al. Multiresidue analysis of pesticides in soil by supercritical fluid extraction/gas chromatography with electron-capture detection and confirmation by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53 (1): 62-69
46. Khan S U. Supercritical fluid extraction of bound pesticide residues from soil and food commodities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43 (6): 1718-1723
47. Ali M A, Baugh P J. Sorption-desorption studies of six pyrethroids and mirex on soils using GC/MS-NICI. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 2003, 83 (11): 923-933
48. You J, Weston D P, Lydy M J. A sonication extraction method for the analysis of pyrethroid, organophosphate, and organochlorine pesticides from sediment by gas chromatography with electron-capture detection. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2004, 47 (2): 141-147
49. Kuang H, Miao H, Wu Y, et al. Enantioselective determination of cypermethrin in pig muscle tissue by immunoaffinity extraction and high performance liquid chromatography. *International Journal of Food Science & Technology*, 2010, 45 (4): 656-660
50. Fco M, Ejarat E, Baroelo D. Performance of gas chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of pyrethroid insecticides in environmental and food samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2011, 25 (7): 869-876
51. Raepfel C, Nief M, Fabritius M, et al. Simultaneous analysis of pesticides from different chemical classes by using a derivatisation step and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218 (44): 8123-8129
52. San Román I, Alonso M, Bartolomé L, et al. Hollow fiber-based liquid-phase microextraction technique combined with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of pyrethroid insecticides in water samples. *Talanta*, 2012: 246-253
53. Cheng J, Liu M, Yu Y, et al. Determination of pyrethroids in porcine tissues by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography. *Meat Science*, 2009, 82 (4): 407-412
54. Bagheri H, Ghanbarnejad H, Khalilian F. Immersed sol-gel based amino-functionalized SPME fiber and HPLC combined with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection of pyrethroid insecticides from water samples. *Journal of Separation Science*, 2009, 32 (17): 2912-2918

55. Chung S W, Lam C. Development and validation of a method for determination of residues of 15 pyrethroids and two metabolites of dithiocarbamates in foods by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 403 (3): 885-896
56. Ye F, Xie Z, Wong K Y. Monolithic silica columns with mixed mode of hydrophilic interaction and weak anion - exchange stationary phase for pressurized capillary electrochromatography. *Electrophoresis*, 2006, 27 (17): 3373-3380
57. Stanker L H, Bigbee C, Van Emon J, et al. An immunoassay for pyrethroids: detection of permethrin in meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1989, 37 (3): 834-835
58. Skerritt J H, Hill A S, McAdam D P, et al. Analysis of the synthetic pyrethroids, permethrin and 1 (R)-phenothrin, in grain using a monoclonal antibody-based test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40 (7): 1287-1292
59. Shan G, Leeman W R, Stoutamire D W, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the pyrethroid permethrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48 (9): 4032-4040
60. Fullen S, Hock B. Development of Enzyme Immunoassays for the Detection of Pyrethroid Insecticides: I. Monoclonal Antibodies for Allethrin. *Analytical Letters*, 1995, 28 (5): 765-779
61. Kawara M, Bronshtein A, Safi J, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and sol-gel-based immunoaffinity purification (IAP) of the pyrethroid bioallethrin in food and environmental samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54 (18): 6482-6492
62. Cao M, Li M, Yan X, et al. Stereoselectivity of an enzyme-linked, immunosorbent assay for S-bioallethrin. *Analytical Methods*, 2012, 4 (2): 534-538
63. Wengatz I, Stoutamire D W, Gee S J, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the pyrethroid insecticide fenpropathrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46 (6): 2211-2221
64. Shi H-Y, Zhang B-H, Ye Y-H, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the pyrethroid fenpropathrin. *Food and Agricultural Immunology*, 2011, 22 (1): 69-76
65. Gao H, Ling Y, Xu T, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the pyrethroid insecticide cyhalothrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54 (15): 5284-5291
66. Bo L, Hai-Yan S, Ming-Hua W. An Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of Bifenthrin. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2008, 36 (1): 34-38
67. Nichkova M, Fu X, Yang Z, et al. Immunochemical screening of pesticides (simazine and cypermethrin) in orange oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57 (13): 5673-5679
68. Park E-K, Kim J-H, Gee S J, et al. Determination of pyrethroid residues in agricultural products by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52 (18): 5572-5576
69. Kong Y, Zhang Q, Zhang W, et al. Development of a monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for the pyrethroid insecticide deltamethrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58 (14): 8189-8195
70. Lee H-J, Shan G, Watanabe T, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the pyrethroid deltamethrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50 (20): 5526-5532
71. Queffelec A L, Nodet P, Haelters J P, et al. Hapten synthesis for a monoclonal antibody based ELISA for deltamethrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46 (4): 1670-1676
72. Jiang J, Zhang D, Zhang W, et al. Preparation, identification, and preliminary application of monoclonal antibody against pyrethroid insecticide fenvalerate. *Analytical Letters*, 2010, 43 (17): 2773-2789
73. Song Y, Lu Y, Liu B, et al. A sensitivity - improved enzyme - linked immunosorbent assay for fenvalerate: a new approach for hapten synthesis and application to tea samples. *Journal of the*

Science of Food and Agriculture, 2011, 91 (12): 2210-2216

74. Lu X-Q, Zhang B-H, Shi H-Y, et al. The research on enzyme-linked immunosorbent assay for fenvalerate. Food and Agricultural Immunology, 2009, 20 (2): 147-154

75. Shan G, Stoutamire D W, Wengatz I, et al. Development of an immunoassay for the pyrethroid insecticide fenvalerate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47 (5): 2145-2155

76. Nakata M, Fukushima A, Ohkawa H. A monoclonal antibody - based ELISA for the analysis of the insecticide flucythrinate in environmental and crop samples. Pest Management Science, 2001, 57 (3): 269-277

77. Watanabe T, Shan G, Stoutamire D W, et al. Development of a class-specific immunoassay for the type I pyrethroid insecticides. Analytica Chimica Acta, 2001, 444 (1): 119-129

78. Mak S K, Shar G, Lee H-J, et al. Development of a class selective immunoassay for the type II pyrethroid insecticides. Analytica Chimica Acta, 2005, 534 (1): 109-120

79. Hao X, Kuang H, Li Y, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the α -cyano pyrethroids multiresidue in Tai lake water. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57 (8): 3033-3039

80. 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. Food and Agricultural Immunology, 2011, (ahead-of-print): 1-20

81. Lu Y, Xu N, Zhang Y, et al. Development of general immunoassays for pyrethroids: a new approach for hapten synthesis using pyrethroid metabolite analogue and application to food samples. Food and Agricultural Immunology, 2010, 21 (1): 27-45

82. Kuang H, Wu Y, Hou X, et al. Synthesis of derivatives and production of antiserum for class specific detection of pyrethroids by indirect ELISA. International Journal of Environmental and Analytical Chemistry, 2009, 89 (6): 423-437

83. Wang J, Yu G, Sheng W, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay based a monoclonal antibody for the detection of pyrethroids with phenoxybenzene multiresidue in river water. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59 (7): 2997-3003

84. Zhang Q, Zhang W, Wang X, et al. Immunoassay development for the class-specific assay for types I and II pyrethroid insecticides in water samples. Molecules, 2010, 15 (1): 164-177

85. Liu J, Zhang Q, Zhang W, et al. Development of a fluorescence-linked immunoassay based on quantum dots for fenvalerate. Food and Agricultural Immunology, 2013, DOI:10.1080/09540105.2012.749220

86. Weng M, Kang H, Xu D, et al. Label-free Impedimetric Immunosensor for Sensitive Detection of Fenvalerate in Tea. Food Chemistry, 2013, 141(1):84-90

87. Kranthi K, Davis M, Mayze C, et al. Development of a colloidal-gold based lateral-flow immunoassay kit for 'quality-control' assessment of pyrethroid and endosulfan formulations in a novel single strip format. Crop Protection, 2009, 28 (5): 428-434

88. Li Y, Cui Z, Li D, et al. Colorimetric determination of pyrethroids based on core-shell Ag@ SiO₂ nanoparticles. Sensors and Actuators B: Chemical, 2011, 155 (2): 878-883

89. Li H, Li Y, Cheng J. Molecularly imprinted silica nanospheres embedded CdSe quantum dots for highly selective and sensitive optosensing of pyrethroids. Chemistry of Materials, 2010, 22 (8): 2451-2457

90. Sundari P A, Manisankar F. Development of ultrasensitive surfactants doped poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)/multiwalled carbon nanotube sensor for the detection of pyrethroids and an organochlorine pesticide. Journal of Applied Electrochemistry, 2011, 41 (1): 29-37

91. Zhao P, Yu J, Liu S, et al. One novel chemiluminescence sensor for determination of fenpropathrin based on molecularly imprinted porous hollow microspheres. Sensors and Actuators B: Chemical, 2012, 162 (1): 166-172

92. Pirkle W H, Finn J M. Chiral high-pressure liquid chromatographic stationary phases. 3. General resolution of arylalkylcarbinols. *The Journal of Organic Chemistry*, 1981, 46 (14): 2935-2938
93. Lisseter S G Hambling S G Chiral high-performance liquid chromatography of synthetic pyrethroid insecticides. *Journal of Chromatography A*, 1991, 539 (1): 207-210
94. Ôi N, Kitahara H, Kira R. Enantiomer separation of pyrethroid insecticides by high-performance liquid chromatography with chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 1990, 515: 441-450
95. Liu W, Gan J, Lee S, et al. Isomer selectivity in aquatic toxicity and biodegradation of bifenthrin and permethrin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2005, 24 (8): 1861-1866
96. Ye J, Wu J, Liu W. Enantioselective separation and analysis of chiral pesticides by high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28 (10): 1148-1163
97. Li Z, Zhang Z, Zhang L, et al. Isomer-and enantioselective degradation and chiral stability of fenpropathrin and fenvalerate in soils. *Chemosphere*, 2009, 76 (4): 509-516
98. Xu C, Tu W, Lou C, et al. Enantioselective separation and zebrafish embryo toxicity of insecticide beta-cypermethrin. *Journal of Environmental Sciences*, 2010, 22 (5): 738-743
99. Edwards D P, Ford M G. Separation and analysis of the diastereomers and enantiomers of cypermethrin and related compounds. *Journal of Chromatography A*, 1997, 777 (2): 363-369
100. Kim B H, Lee S U, Kim K T, et al. Enantiomeric discrimination of pyrethroid acid esters on polysaccharide derived chiral stationary phases. *Chirality*, 2003, 15 (3): 276-283
101. Faraoni M, Messina A, Polcare C M, et al. Chiral Separation of Pesticides by Coupled - Column Liquid Chromatography Application to the Stereoselective Degradation of Fenvalerate in Soil. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2005, 27 (6): 995-1012
102. Ma Y, Chen L, Lu X, et al. Enantioselectivity in aquatic toxicity of synthetic pyrethroid insecticide fenvalerate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72 (7): 1913-1918
103. Shishovska M, Trajkovska V. HPLC - method for determination of permethrin enantiomers using chiral β - cyclodextrin - based stationary phase. *Chirality*, 2010, 22 (5): 527-533
104. Hardt I H, Wolf C, Gehrcke B, et al. Gas chromatographic enantiomer separation of agrochemicals and polychlorinated biphenyls (PCBs) using modified cyclodextrins. *Journal of High Resolution Chromatography*, 1994, 17 (12): 859-864
105. Liu W, Gan J J, Lee S, et al. Isomer selectivity in aquatic toxicity and biodegradation of cypermethrin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2004, 52 (20): 6233-6238
106. Liu W, Gan J J. Separation and analysis of diastereomers and enantiomers of cypermethrin and cyfluthrin by gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52 (4): 755-761
107. Kuang H, Miao H, Hon X, et al. Determination of enantiomeric fractions of cypermethrin and cis - bifenthrin in Chinese teas by GC/ECD. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90 (8): 1374-1379
108. Shen D, Pennetsa K V, Leidy R B. Enantiomeric and isomeric separation of pesticides by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *Journal of AOAC International*, 1999, 82: 1550-1561
109. Pérez - Fernández V, García M Á, Marina M L. Enantiomeric separation of cis - bifenthrin by CD - MEKC: Quantitative analysis in a commercial insecticide formulation. *Electrophoresis*, 2010, 31 (9): 1533-1539
110. Galve R, Camps F, Sanchez-Baeza F, et al. Development of an immunochemical technique for the analysis of trichlorophenols using theoretical models. *Analytical Chemistry*, 2000, 72 (10): 2237-2246
111. Vass M, Diblikova I, Carnuch I, et al. ELISA for semicarbazide and its application for screening

- in food contamination. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 608 (1): 86-94
112. 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. *Analytical Chemistry*, 2010, 82 (22): 9314-9321
113. Pinacho D G, Sánchez-Baeza F, Marco M-P. Molecular Modeling Assisted Hapten Design To Produce Broad Selectivity Antibodies for Fluoroquinolone Antibiotics. *Analytical Chemistry*, 2012, 84 (10): 4527-4534
114. Wang Z, Zou Y, Ding S, et al. Development of a monoclonal antibody-based broad-specificity ELISA for fluoroquinolone antibiotics in foods and molecular modeling studies of cross-reactive compounds. *Analytical Chemistry*, 2007, 79 (12): 4471-4483
115. Zhang Y-F, Ma Y, Gao Z-X, et al. Predicting the cross-reactivities of polycyclic aromatic hydrocarbons in ELISA by regression analysis and CoMFA methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 397 (6): 2551-2557
116. Yuan M, Liu B, Liu E, et al. Immunoassay for Phenylurea Herbicides: Application of Molecular Modeling and Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis on an Antigen-Antibody Interaction Study. *Anal Chem*, 2011, 83 (12): 4767-4774
117. Wang Z, Luo P, Cheng L, et al. Hapten-antibody recognition studies in competitive immunoassay of α -zearalanol analogs by computational chemistry and Pearson Correlation analysis. *Journal of Molecular Recognition*, 2011, 24 (5): 815-823
118. Weng Z, Kei Z, Deier R C, et al. Investigation of antigen-antibody interactions of sulfonamides with a monoclonal antibody in a fluorescence polarization immunoassay using 3D-QSAR models. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13 (5): 6334-6351
119. Zhang Y F, Zhang L, Gao Z X, et al. Investigating the Quantitative Structure-Activity Relationships for Antibody Recognition of Two Immunoassays for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Multiple Regression Methods. *Sensors*, 2012, 12 (7): 9363-9374
120. Lee N, McAdam D P, Skerritt J H. Development of immunoassays for type II synthetic pyrethroids. I. Hapten design and application to heterologous and homologous assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1998, 46 (2): 520-534
121. Shan G, Wengatz I, Stoutamire D W, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of esfenvalerate metabolites in human urine. *Chemical research in toxicology*, 1999, 12 (11): 1033-1041
122. Kendo M, Tsuzuki K, Hamada H, et al. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Residue Analysis of the Fungicide Azoxystrobin in Agricultural Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60 (4): 904-911
123. Kuang H, Xu L, Cui G et al. Development of determination of di-n-octyl phthalate (DOP) residue by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Food and Agricultural Immunology*, 2010, 21 (3): 265-277
124. Lin F, Song S, Liu L, et al. Development of the detection of benzophenone in recycled paper packaging materials by ELISA. *Food and Agricultural Immunology*, 2011, 22 (1): 39-46
125. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256 (5517): 495-497
126. Peng J, Meng X, Deng X, et al. Development of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of ovalbumin in foods. *Food and Agricultural Immunology*, 2012, DOI:10.1080/09540105.2012.716398
127. Sun F, Liu L, Kuang H, et al. Development of ELISA for melamine detection in milk powder. *Food and Agricultural Immunology*, 2013, 24(1):79-86
128. Song S, Lin F, Liu L, et al. Immunoaffinity removal and immunoassay for rhodamine B in chili powder. *International Journal of Food Science & Technology*, 2010, 45 (12): 2589-2595

129. Karpinski K. Optimality assessment in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Biometrics*, 1990, : 381-390
130. Elliott M., James N. Synthetic pyrethroids—a new class of insecticide. *Chemical Society Reviews*, 1978, 7 (4): 473-505
131. Mekebi A, Crane D, Blondina G, et al. Extraction and analysis methods for the determination of pyrethroid insecticides in surface water, sediments and biological tissues at environmentally relevant concentrations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, 80 (5): 455-460
132. Lao W, Maruya K A, Tsukada D. A two-component mass balance model for calibration of solid-phase microextraction fibers for pyrethroids in seawater. *Analytical Chemistry*, 2012, 84 (21): 9362-9369
133. Liu L, Cheng J, Matsadiq G, et al. Application of DLLME to the determination of pyrethroids in aqueous samples. *Chromatographia*, 2010, 72 (9-10): 1017-1020
134. Xie H, Ma W, Liu L, et al. Development and validation of an immunochromatographic assay for rapid multi-residues detection of cepheids in milk. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 634 (1): 129-133
135. Sun F, Liu L, Ma W, et al. Rapid on-site determination of melamine in raw milk by an immunochromatographic strip. *International Journal of Food Science & Technology*, 2012, 47 (7): 1505-1510
136. ArunKumar S, Basith S A, Gomathinayagam S. A comparative analysis on serum antibody levels of sheep immunized with crude and thiol-purified excretory/secretory antigen of *Haemonchus contortus*. *Veterinary World*, 2012, 5 (5): 279-284
137. Datta M, Kavira A. Acute toxicity of the synthetic pyrethroid pesticide fenvalerate to some air breathing fishes. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 2011, 93 (10): 2034-2039
138. Beltran J, Peruga A, Pitarch E, et al. Application of solid-phase microextraction for the determination of pyrethroid residues in vegetable samples by GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, 376 (4): 502-511
139. Qian S, Bau H H. Analysis of lateral flow biodefectors: competitive format. *Analytical Biochemistry*, 2004, 326 (2): 211-224
140. Paek S-H, Lee S-H, Cho J-H, et al. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. *Methods*, 2000, 22 (1): 53-60
141. Verheijen R, Stouten P, Cazemier G, et al. Development of a one step strip test for the detection of sulfadimidine residues†. *Analyst*, 1998, 123 (12): 2437-2441
142. Kuang H, Chen W, Yan W, et al. Crown ether assembly of gold nanoparticles: melamine sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26 (5): 2032-2037
143. Yuan Y, Zhang J, Zhang H, et al. Label-free colorimetric immunoassay for the simple and sensitive detection of neurogenin3 using gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26 (10): 4245-4248
144. Li X H, Dai L, Liu Y, et al. Ionic - Liquid - Doped Polyaniline Inverse Opals: Preparation, Characterization, and Application for the Electrochemical Impedance Immunoassay of Hepatitis B Surface Antigen. *Advanced Functional Materials*, 2009, 19 (19): 3120-3128
145. Wang L, Zhu Y, Xu L, et al. Side - by - Side and End - to - End Gold Nanorod Assemblies for Environmental Toxin Sensing. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49 (32): 5472-5475
146. Haiss W, Thanh N T, Aveyard J, et al. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. *Analytical Chemistry*, 2007, 79 (11): 4215-4221
147. Raha P, Banerjee H, Das A K, et al. Persistence kinetics of endosulfan, fenvalerate, and decarathrin in and on eggplant (*Solanum melongena* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41 (6): 923-928
148. Jordan E G, Kaulinan D D. Degradation of cis-and trans-permethrin in flooded soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1986, 34 (5): 880-884

149. Jiang B, Wang H, Fu Q M, et al. The chiral pyrethroid cycloprothrin: Stereocisomer synthesis and separation and stereoselective insecticidal activity. *Chirality*, 2008, 20 (2): 96-102
150. Pérez-Fernández V, García M Á, Marina M L. Characteristics and enantiomeric analysis of chiral pyrethroids. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217 (7): 968-989
151. Geva M, Izhaky D, Mickus D E, et al. Stereoselective Recognition of Monolayers of Cholesterol, ent-Cholesterol, and Epicholesterol by an Antibody. *ChemBioChem*, 2001, 2 (4): 265-271
152. Hofstetter O, Hofstetter H, Wilchek M, et al. Chiral discrimination using an immunosensor. *Nature Biotechnology*, 1999, 17 (4): 371-374
153. Izhaky D, Addadi L. Stereoselective interactions of a specialized antibody with cholesterol and epicholesterol monolayers. *Chemistry-A European Journal*, 2000, 6 (5): 869-874
154. Liu W, Gan J J, Qin S. Separation and aquatic toxicity of enantiomers of synthetic pyrethroid insecticides. *Chirality*, 2005, 17 (S1): S127-S133
155. Fetoui H, Garoui E M, Zeghal N. Lambda-cyhalothrin-induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats: ameliorative effect of ascorbic acid. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2009, 61 (3): 189-196
156. Fetoui H, Makni M, Mouldi Garoui E, et al. Toxic effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroid pesticide, on the rat kidney: Involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2010, 62 (6): 593-599

附 录：作者在攻读博士学位期间发表的论文与专利

发表论文：

1. Xiujin Chen, Liguang Xu, Wei Ma, Liqiang Liu, Hua Kuang, Libing Wang and Chuanlai Xu. General immunoassay for pyrethroids based on monoclonal antibody. *Food and Agricultural Immunology*. 2013, DOI:10.1080/09540105.2013.794328 (与第 2 章有关, IF 0.74)

2. Xiujin Chen, Liguang Xu, Wei Ma, Liqiang Liu, Hua Kuang, Chifang Peng, Libing Wang, and Chuanlai Xu. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Cyhalothrin Immunological Investigations. 2013, DOI: 10.3109/08820139.2013.797909 (与第 5 章有关, IF 1.16)

3. Xiujin Chen, Liqiang Liu, Hua Kuang, Shanshan Song, Chuanlai Xu. Strip-based immunoassay for rapid determination of fenpropathrin. *The International Journal of Food Science and Technology*, 2013(accepted, 与第 3 章有关, IF 1.26)

4. Hua Kuang, Gang Cui, Xiujin Chen, Honghong Yir, Qianqian Yong, Liguang Xu, Chifang Peng, Libing Wang, and Chuanlai Xu et al., A one-step homogeneous immunoassay using magnetic nanoparticles and a quantum dot sandwich for *Salmonella* detection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, 14(4), 8603-8610 (IF 2.60)

5. 胥传来, 陈秀金, 任国艳. 拟除虫菊酯及其代谢物免疫检测研究进展. *食品与生物技术学报*, 2012, 31(3): 238-246 (CSCD, 与第 1 章有关)

6. 陈秀金, 尹红红, 匡华, 胥传来. 沙门氏菌 MALDI-TOF-MS 蛋白质指纹图谱分析方法研究. *食品与生物技术学报*, 2012, 31(11): 1189-1197

专利：

1. 王利兵, 胥传来, 陈秀金. 一种功夫菊酯半抗原的合成方法, 申请号 201110271124.X

2. 王利兵, 胥传来, 陈秀金. 一种 II 类拟除虫菊酯人工抗原的合成方法, 申请号 201110271143.2

3. 匡华, 陈秀金, 郭金英, 刘丽强, 胥传来, 王利兵, 一种基于计算机分子模拟技术的拟除虫菊酯类的半抗原设计, 申请号 201210401857.5