

溴虫腈半抗原及全抗原合成与鉴定

刘顺字, 徐汉虹

(1 天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 华南农业大学 昆虫毒理研究室, 广东 广州 510642)

摘要:以杀虫剂溴虫腈为起始原料,合成了半抗原4-溴-2-(对氯苯基)-1-乙氧基甲基-5-(三氟甲基)吡咯-3-甲胺(简称 CFP—NH₂)。通过戊二醛法将该半抗原分别与牛血清白蛋白(BSA)和卵清白蛋白(OVA)进行偶联得到全抗原,经紫外光谱法鉴定后,用三硝基苯磺酸法(TNBS)测得2 偶联物偶联比分别为 22:1 和 15:1。以 CFP—NH₂-BSA 免疫新西兰白兔、CFP—NH₂-OVA 为包被原,对其抗血清进行间接竞争酶联免疫吸附测定(ELISA),测得抗血清效价为 2.56×10^4 ,抗血清竞争性抑制试验表明,溴虫腈质量浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 时,其抑制率达 80% 以上,进一步证明抗原合成成功。

关键词:溴虫腈; 半抗原; 全抗原; 合成; 鉴定

中图分类号:Q503

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2009)02-0048-05

Synthesis and Identification of the Hapten and Complete Antigen of Chlorfenapyr

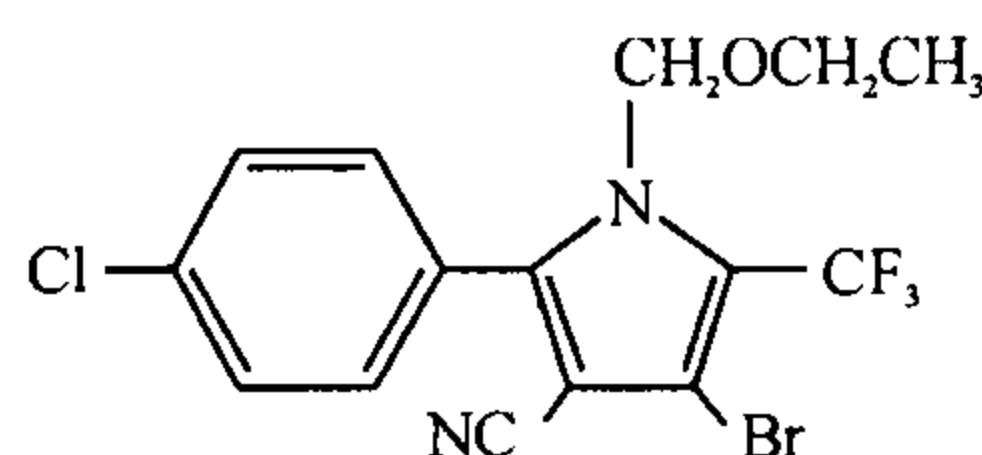
LIU Shun-zi, XU Han-hong

(The Key Laboratory of Nature Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: (4-bromo-2-(4-chlorophenyl)-1-(ethoxymethyl)-5-(trifluoromethyl)-1H-pyrrol-3-yl) methanamine, a hapten of chlorfenapyr (CFP—NH₂), was synthesized by using technical grade chlorfenapyr. The hapten was conjugated to bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) to form the complete antigens with glutaraldehyde method. The ratio came to 22:1 and 15:1, respectively, which were confirmed by ultraviolet spectrum method firstly and then by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid method (TNBS). Rabbits were immunized with CFP—NH₂-BSA and competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the results indicated that the titer of antisera was 2.56×10^4 , and the inhibition ratio was more than 80% when the mass concentration of the chlorfenapyr was 40 $\mu\text{g/mL}$, which had further verified the success of synthesis.

Key words: chlorfenapyr; hapten; complete antigen; synthesis; identification

溴虫腈(Chlorfenapyr)是一个极具特色的高效杀虫杀螨剂,其结构式为:



溴虫腈广泛地应用于蔬菜、茶树、果树等的虫害防治,被誉为 20 世纪 90 年代发现的最具有发展潜力的三大农药杀虫剂之一^[1]。因其残留期较长,对鱼和鸟类具有中至高的毒性^[2],对小鼠肝、脾等细胞的 DNA 产生损伤^[3,4],能产生脑瘤、肝细胞腺瘤等恶性组织内瘤^[5],所以引起了人们的广泛关注^[6]。溴

收稿日期:2008-12-02

作者简介:刘顺字(1981—),男,硕士研究生;通讯作者:徐汉虹(1961—),男,教授,博士,E-mail: hhxu@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(30840058)

虫腈被我国农业部推荐为替代甲胺磷等高毒农药品种后,使用量日益上升,残留超标的风险越来越大,我国尚没有溴虫腈残留和安全间隔期的标准,目前均采用美国环保署的相关规定,溴虫腈的残留检测主要依靠色谱等分析方法^[7-8],虽然结果准确,但设备昂贵,需专业人员操作,并且样品前处理繁琐,很难满足蔬菜、水果等样品批量快速检测的要求^[9].免疫分析技术作为简单、快速、灵敏、成本低廉的筛选检测方法,近年来在农药残留分析领域的应用越来越广泛,制备出高特异性抗体是建立免疫分析方法的必要前提,半抗原和全抗原的设计是整个试验的关键.至今国内鲜见溴虫腈免疫分析的研究报道,本研究就其半抗原和全抗原合成进行了初步的探索,以期为溴虫腈的免疫分析方法奠定基础.

1 材料与方法

1.1 仪器

85-2 型恒温磁力搅拌器,上海司乐仪器公司;LABOROTA4001 型旋转蒸发仪,德国 Heidolph 公司;2550 紫外-可见分光光度计,Shimadzu 公司;Bruker600 型核磁共振仪,瑞士 Bruker 公司;Ultrospec 4000,PharmaciaBiotech 公司;Agilent 5975 型气质联用仪,Agilent 公司;Stat Fax 2600 自动洗板机,美国 Awareness 公司;DG23022 型酶联免疫检测仪,上海国营华东电子管厂;移液器,法国 Gilson 公司.

1.2 主要试剂和试验动物

$w = 95\%$ 溴虫腈原药,博凯生物化工有限公司;牛血清白蛋白(BSA, M_r 为 67 000)、卵清蛋白(OVA, M_r 为 45 000),Sigma 公司;2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS),Fluka 公司;羊抗兔酶标二抗,捷倍思生物科技有限公司;弗氏完全、不完全佐剂, Sigma 公司;其他试剂均为市售分析纯.

试验动物:新西兰白兔 3 只,每只 2~3 kg,雄性,分别标注为兔 1、兔 2、兔 3,购于广东省医学实验动物中心.

1.3 方法

1.3.1 半抗原的合成 在 N_2 保护下,将 0.95 g $LiAlH_4$ 加入到 5 mL 四氢呋喃(THF)中,搅拌均匀后缓慢滴入溶有 0.33 g $AlCl_3$ 的 THF 溶液 5 mL,室温下搅拌 10 min 后,缓慢滴入溶有 10.18 g 溴虫腈原药的 THF 溶液 30 mL,冰浴上搅拌 20 min 后,室温下反应 2 h,加入水和甲醇各 30 mL 终止反应,减压浓缩,混合物用二氯甲烷(30 mL $\times$ 3)萃取,萃取层水洗(30 mL $\times$ 3)后经无水硫酸钠干燥,减压浓缩,柱层析

分离得到浅黄色液态目标产物(CFP— NH_2) 1.94 g.

1.3.2 半抗原的鉴定 参考麦燕玲等^[7]的检测条件,采用气质联用(GC-MS)法和核磁共振(1H -NMR)对目标产物(CFP— NH_2)进行鉴定.

1.3.3 全抗原的合成 称取半抗原(CFP— NH_2) 82.20 mg 置于 25 mL 的圆底烧瓶中,加入 2 mL N,N -二甲基甲酰胺,搅拌均匀后,缓慢滴入 0.2 mL 戊二醛($w = 25\%$),室温下搅拌反应 4 h,其颜色由浅黄变深黄,取 800 μ L 此溶液平均分成 2 份,分别缓慢地注入到均用 5 mL PBS(0.01 mol/L pH7.4 的磷酸缓冲液)预溶好的 90 mg BSA 和 90 mg OVA 中,冰浴上避光反应 5 h 后,将各自反应产物装入透析袋,先蒸馏水(500 mL $\times$ 3)透析,再 PBS 透析 3 d(每隔 6 h 换液 1 次),然后 1 000 r/min 离心 5 min,取其上清液冷冻干燥,保存于 $-20^\circ C$ 冰箱中备用,分别得到偶联产物 CFP— NH_2 —BSA 和 CFP— NH_2 —OVA.

1.3.4 全抗原的紫外光谱鉴定 以含二甲基亚砜($\varphi = 5\%$)的 PBS 分别配制 1 mg/mL 的载体蛋白(BSA、OVA)溶液、1 mg/mL 的偶联物溶液和 0.1 mg/mL 半抗原溶液,以含二甲基亚砜($\varphi = 5\%$)的 PBS 溶液作对照,在 200~400 nm 波长下进行紫外吸收光谱扫描.

1.3.5 全抗原结合比的测定 参考 Shyder 等^[10]的方法,采用 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)比色法进行标准曲线制作和样品测定:

(1) 标准曲线制作:将 BSA、OVA 用 PBS 分别配制成质量浓度为 0、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mg/mL 的溶液,各取 1 mL 加入到 1 mL $w = 4\%$ 的碳酸氢钠($pH = 8.5$)^[11]溶液中,再加入 1 mL $w = 0.1\%$ 的 TNBS 溶液,40 $^\circ C$ 恒温水浴中避光下反应 30 min,在 420 nm 波长下进行比色,根据 $D_{420\text{ nm}}$ 和蛋白质浓度作出标准曲线,曲线斜率即为单位浓度的光密度.

(2) 样品测定:将 CFP— NH_2 —BSA、CFP— NH_2 —OVA 用 PBS 分别配制成质量浓度为 0、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mg/mL 的溶液,其余步骤同(1).

(3) 结合比的计算:全抗原氨基消耗率 = (载体蛋白单位浓度光密度 - 全抗原单位浓度光密度)/载体蛋白单位浓度光密度;全抗原与载体蛋白的结合比 = 全抗原氨基消耗率 $\times$ 每分子载体蛋白氨基个数.

载体蛋白的游离氨基大部分来自赖氨酸,每分子 BSA 和 OVA 的赖氨酸个数分别以 56 和 20 计算^[12].

1.3.6 免疫动物及抗血清的鉴定 免疫方案和抗血清间接竞争 ELISA 法参考朱国念等^[13], 收凝过程为取血后室温静置 1 h, 然后用针剥离离心管壁上粘附的凝固的血液, 4 ℃ 下过夜. 以 CFP—NH₂—OVA 为包被原, 检测波长为 490 nm.

为了鉴定抗血清中是否有针对溴虫腈的抗体存在, 采用张献忠等^[14] 抗血清竞争抑制试验, 其包被抗原质量浓度为 5 μg/mL, 兔 1 抗血清稀释倍数为 5 000 倍.

2 结果与分析

2.1 半抗原鉴定

采用气质联用(GC-MS)鉴定得到的 CFP—NH₂, 溴虫腈保留时间分别为 10.37 和 10.58 min; 半抗原 CFP—NH₂ 质谱图见图 1.

对 CFP—NH₂ 进行 GC-MS 鉴定, 出现 CFP—NH₂ 分子离子峰 m/z 为 411/413 (77:100) ($M+H$)⁺, 是标准的含 1 个 Br 和 1 个 Cl 的天然同位素

峰, 图中目标产物(CFP—NH₂) 分子离子峰较溴虫腈相对分子质量增加 4, 与腈基还原成氨基后增加 4 个 H 相一致, 对其碎片离子峰进行分析, 各种碎片都能合理归属, 因此可初步判断目标半抗原 CFP—NH₂ 的分子结构正确. 其可能的质谱裂解途径见图 2.

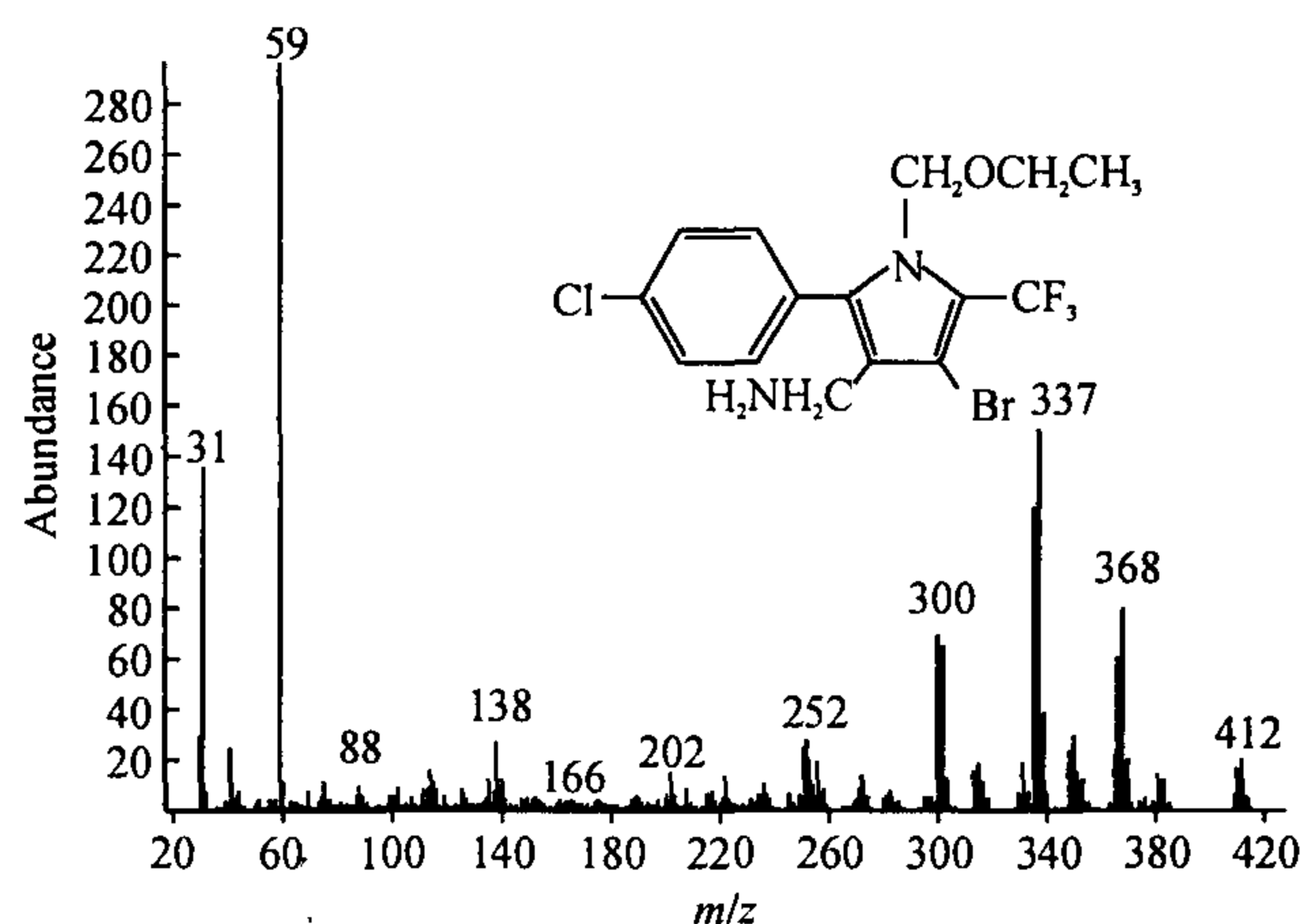


图 1 溴虫腈半抗原(CFP—NH₂) 质谱图

Fig. 1 MS of hapten antigen of chlorfenapyr(CFP—NH₂)

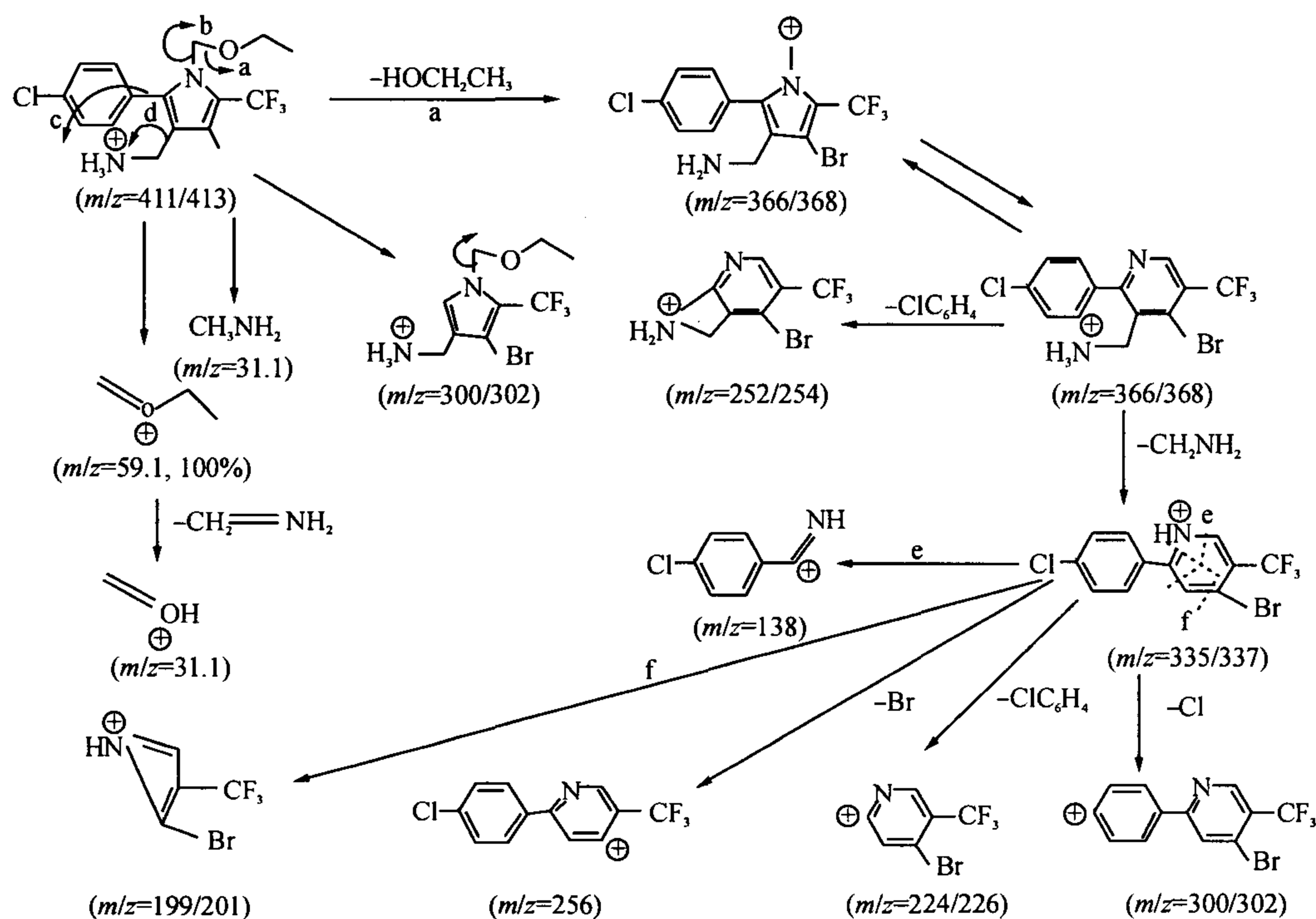


图 2 溴虫腈半抗原(CFP—NH₂) 可能的质谱裂解途径

Fig. 2 Possible pathway of fragmentation of hapten antigen of chlorfenapyr(CFP—NH₂)

为了进一步鉴定半抗原的结构, 进行 CFP—NH₂ 氢核磁共振鉴定, 结果见图 3, ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.27 (dd, $J = 18$ Hz, 2H, Ar—H), 7.37 (dd, $J = 18$ Hz, 2H, Ar—H), 5.097 (s, 2H, —N—CH₂—O), 3.54 (s, 2H, —CH₂—N), 3.29 ~ 3.33 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H, —O—CH₂—),

1.253 (br, 1H, NH₂, 部分已被溶剂中的重水所氘代), 1.19 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H, —CH₃), 与溴虫腈的氢谱^[15] 比较, 在 $\delta = 3.544$ 处增加了与 Ar—CH₂—NH₂ 中亚甲基相符的峰, 在 $\delta = 1.253$ 处出现了与氨基相符的峰, 确定合成的半抗原为目标化合物.

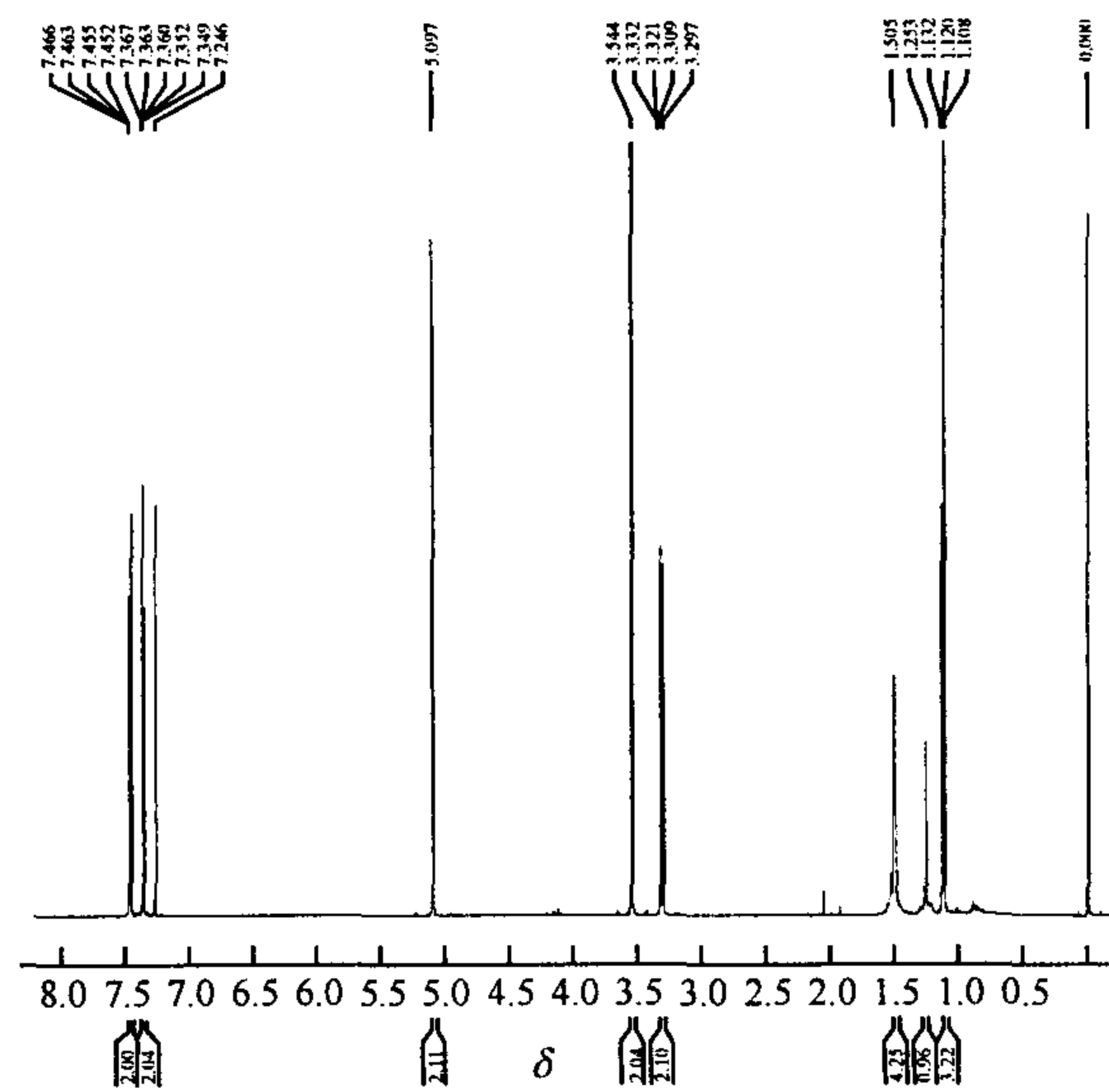


图 3 溴虫腈半抗原(CFP—NH₂)氢核磁共振图

Fig.3 ¹H NMR of hapten antigen of chlorfenapyr(CFP—NH₂)

2.2 全抗原鉴定

鉴定人工抗原常用紫外光谱法,载体蛋白与半抗原通常有不同的紫外吸收,当半抗原与载体蛋白偶联后,偶合物中就会同时出现载体蛋白和半抗原的吸收峰.从图 4 可看出,偶联后的 CFP—NH₂—BSA 谱线总体明显高于 BSA 与 CFP—NH₂ 二者的谱线,其最大吸收峰与 CFP—NH₂ 一致,应为 CFP—NH₂ 连接 BSA 上所贡献的特征峰,CFP—NH₂—BSA 有一肩峰,位于 BSA 最大吸收峰附近,推测为 BSA 与 CFP—NH₂ 偶联后两者吸收累加所致,初步证明 CFP—NH₂—BSA 偶联成功;CFP—NH₂—OVA 紫外吸收光谱峰形发生了显著的变化,其最大吸收峰在 CFP—NH₂ 和 OVA 之间,应为 CFP—NH₂ 和 OVA 偶联后吸收累加所致,CFP—NH₂—OVA 谱线总体较低,推测 OVA 分子上与戊二醛连接的氨基数量有限,多余的 CFP—NH₂ 分子从透析袋中透析出来或离心时被沉降除去,初步证明 CFP—NH₂—OVA 偶联成功.

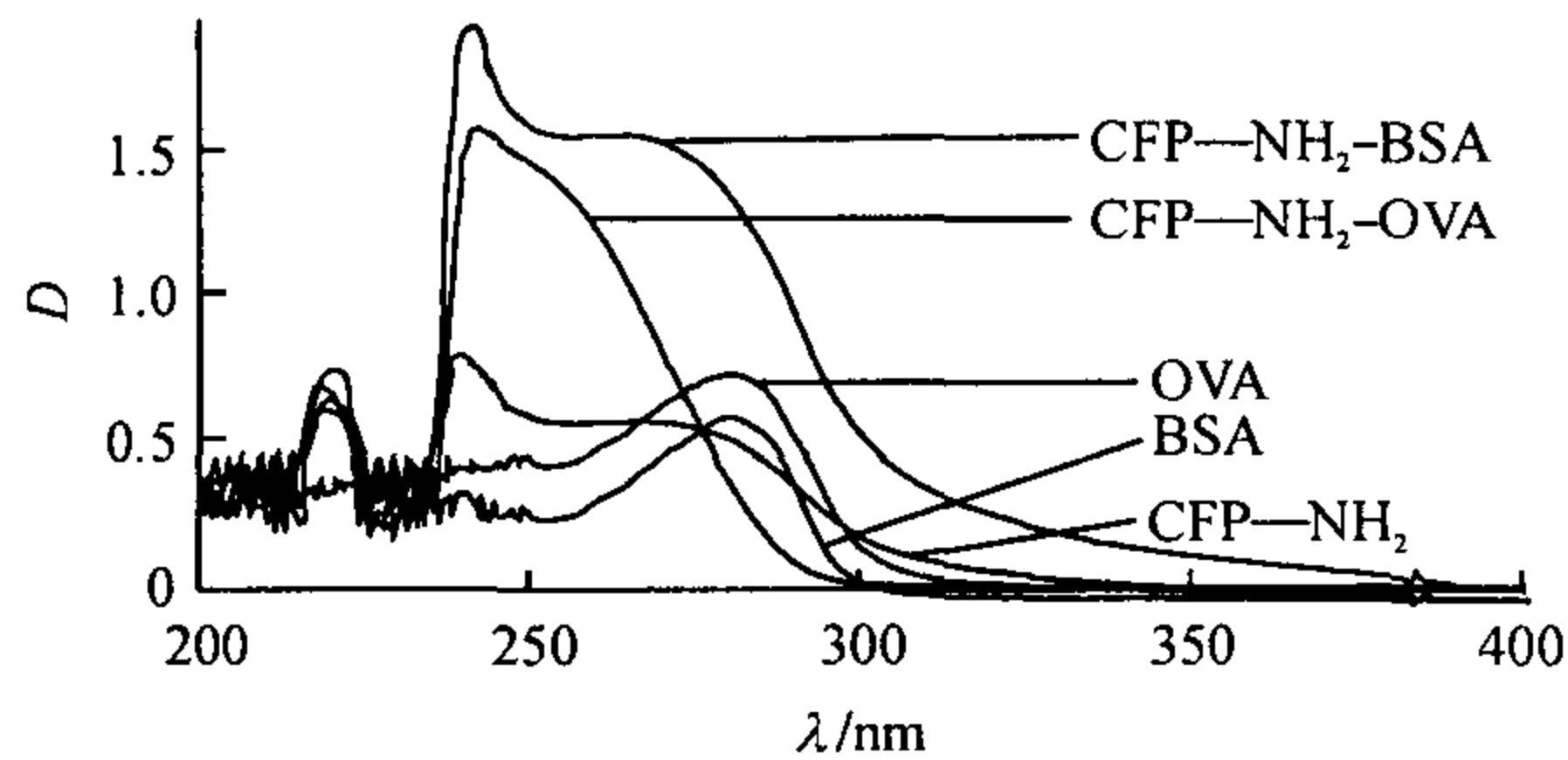


图 4 溴虫腈半抗原(CFP—NH₂)和载体蛋白偶联前后的紫外光谱图

Fig.4 Ultraviolet spectrum of hapten antigen of chlorfenapyr (CFP—NH₂) and carrier proteins coupled and uncoupled

TNBS 法是一种用于测定游离氨基酸的化学比色法,其原理是 TNBS 能特异性地与赖氨酸的第 5 位游离氨基结合,并呈现稳定的黄色,根据测定偶联前后的游离氨基含量即可推测出其氨基与半抗原上的羧基偶联的程度^[16].在配制好的溶液中加入 TNBS 溶液后,载体蛋白和偶联物在 40 ℃ 恒温水浴中避光下反应 30 min,进行全波长扫描,其 4 种物质的最大吸收峰均在 420 nm 附近,故选此波长测定光密度,CFP—NH₂—BSA 和 CFP—NH₂—OVA 偶联比分别为 22:1 和 15:1(表 1).与通常认为每一载体蛋白上含有 8~25 个半抗原时能得到效价较高的抗体^[17-18]相一致.

表 1 TNBS 法测定溴虫腈全抗原偶联结合比结果

Tab.1 Carrier protein ratio of artificial antigen of chlorfenapyr were confirmed by TNBS

全抗原	<i>D</i> _{420 nm}	全抗原氨基消耗率	全抗原与载体蛋白的偶联结合比
CFP—NH ₂ —BSA	0.431 2	0.392 8	22:1
CFP—NH ₂ —OVA	0.188 5	0.752 2	15:1

2.3 抗血清的鉴定

随着免疫次数的增加,抗血清的效价逐渐升高,第 3 次免疫后,兔 1 和兔 3 的抗血清效价均达到 6 400,兔 2 低于 1 600,第 5 次免疫后,兔 1 和兔 3 抗血清效价均达到 25 600,兔 2 为 12 800.

由表 2 可以看出,随着溴虫腈标准品用量的增加,光密度逐渐降低,表明血清中的抗体和游离的溴虫腈发生了抗原抗体亲和反应,当农药质量浓度为 40 μg/mL 时,抑制率达到 86%,表明所制备的抗体对溴虫腈具有较强的结合能力.抗血清中存在针对溴虫腈的抗原表位的抗体,直接证明了溴虫腈农药人工抗原合成成功.

表 2 溴虫腈抗血清竞争性抑制试验结果

Tab.2 The titer of antisera of chlorfenapyr by indirect inhibition ELISA

<i>ρ</i> _{溴虫腈} /(μg·mL ⁻¹)	40	20	10	5	2.5	1.25	CK
<i>D</i> _{490 nm}	0.182 6	0.425 1	0.623 0	0.798 1	0.923 6	1.027 3	1.314 2

3 讨论与结论

通过紫外光谱法和 TNBS 法,均证明偶联反应是成功的,王文佳等^[19]也比较了这 2 个方法,结果表明二者相一致. TNBS 能特异地与蛋白质分子上的自由氨基结合,专一性比较强,对仪器要求更低,操作

也较简单,但如果载体蛋白上自由的氨基与自由的羧基发生自身结合, TNBS 法测得的结合比将偏高^[20],因此当半抗原或全抗原在紫外区无吸收^[12]或不明显时, TNBS 法可作为紫外吸收法的补充。

本试验将溴虫腈吡咯环上的腈基还原成氨基后,通过戊二醛法形成“Schiff's base”的共价连接,在载体蛋白与半抗原之间形成一个 5C“桥”,有利于苯环和吡咯环抗原决定簇暴露于免疫系统,增加获得高亲和力抗体的概率。本研究为其他含有氨基或腈基的小分子物质分子进行半抗原和全抗原设计提供了参考。半抗原和全抗原的合成是非常重要的,如果半抗原的改造或与载体蛋白偶联不成功,产生的抗血清特异性差,识别的化合物就有可能不是目标化合物,交叉反应严重,甚至识别的只是载体蛋白(特别是在第2次加强免疫后容易产生)^[21],所以抗原结构的改造及与载体蛋白偶联的技术路线的科学性与合理是整个试验的关键所在。溴虫腈原药的2条合成路线^[15]与半抗原的质谱图吡咯环上“N—乙氧甲基”a、b 2种可能的裂解途径相一致,这为裂解的碎片找到了合理的归属。初级裂解产物(尤其是溴虫腈的)更有可能在分子结构上同源于本身,如能以之为基础,进行结构衍生化,制备成全抗原,更有可能筛选到理想的抗体。

本研究成功地制备了溴虫腈人工抗原,为溴虫腈试剂盒的开发打下了基础。

致谢:本文得到中国人民解放军军事医学科学院毒物药物研究所杨日芳教授以及华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室朱建永硕士、张信旺硕士、江定心讲师的热情帮助,特此谢忱!

参考文献:

- [1] 孙国强,陆贻. 溴虫腈农药的作用机理、应用及开发前景[J]. 安徽农学通报,2007,13(7):69-71.
- [2] 徐尚成,蒋木庚. 溴虫腈的研究与开发进展[J]. 农药,2003,42(2):5-8.
- [3] 陈贤均,李小燕. 溴虫腈对小鼠脾、肝、肾细胞 DNA 的损伤作用[J]. 环境与职业医学,2005,22(2):145-148.
- [4] 高赛燕,陆贻通,周培,等. 溴虫腈对小鼠外周血淋巴细胞 DNA 的损伤作用[J]. 农药,2005,44(11):511-513.
- [5] EPA. Petition published in Federal Register, July 16, 2003 [EB/OL]. (2005-01-26) [2008-11-15]. <http://www.fluoridealert.org/pesticides/chlorfenapyr-page.htm>.
- [6] ISHIKAWA S, NAETOKO E, KAWAMURA S, et al. Investigation of pesticide residues in foods distributed in Kitakyushu City [J]. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2004, 45(2):87-94.
- [7] 麦燕玲,刘红梅,胡美英,等. 溴虫腈在黄瓜和苋菜中的残留动态研究[J]. 华南农业大学学报,2007,28(1):67-69.
- [8] 陈九星,曹永松,王跃龙,等. 溴虫腈在甘蓝及土壤中的残留检测及降解动态[J]. 环境科学学报,2005(10):1373-1377.
- [9] 雷红涛,沈玉栋,刘文字,等. 甲硝唑半抗原及全抗原合成与鉴定[J]. 华南农业大学学报,2007,28(3):101-104.
- [10] SHYDER S L, SOBOCINSKI P Z. An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines [J]. Anal Biochem, 1975, 64:284-288.
- [11] 吴伟,陆彬,熊素彬,等. 热致变性固化时间与温度对喷雾干燥牛血清白蛋白微球表面活性氨基含量的影响[J]. 中国药理学杂志,1999,34(11):752-754.
- [12] 肖治理,孙远明,张木明,等. 甲胺磷衍生物的合成及人工抗原的制备[J]. 食品科学,2006,27(12):377-380.
- [13] 朱国念,毛黎娟,施海燕,等. 二氯喹啉酸人工抗原的合成与鉴定[J]. 中国农业科学,2005,38(1):86-90.
- [14] 张献忠,李陪武,张文,等. 溴氰菊酯人工抗原合成及鉴定[J]. 中国农学通报,2008,24(7):45-49.
- [15] 徐尚成,蒋木庚,俞幼芬,等. 杀虫剂溴虫腈的合成[J]. 南京农业大学学报,2004,27(2):105-108.
- [16] ERLANGER B F. Principles and methods for the preparation of drug protein conjugates for immunological studies [J]. Pharmacological Reviews, 1973, 25(2):271-280.
- [17] ERLANGER B F. The preparation of antigenic hapten-carrier conjugate: a survey [M] // LANGONE J J, Van VUNAKIS H. Methods in enzymology. New York: Academic press, 1980:70-74.
- [18] 赵肃清,孙远明,乐学义,等. 农药人工抗原合成的研究进展[J]. 农药,2002,41(3):9-11.
- [19] 王文佳,董斌,田素娟,等. 氯霉素全抗原结合比的定量检测研究[J]. 中国医药生物技术,2007,2(5):351-354.
- [20] 蔡勤,孟延发,张志荣. 5-氟尿嘧啶-花生凝集素结合物的制备与结合率测定[J]. 生物医学工程学杂志,2005(3):545-547.
- [21] 张存政,刘贤进,余向阳,等. 对硫磷半抗原改造及其免疫抗体[J]. 南京农业大学学报,2002,25(4):37-40.

【责任编辑 李晓卉】