

快速检测联苯菊酯的胶体金层析试纸条研制

朱海¹, 许稳健¹, 杨星星¹, 付辉¹, 李细清¹, 李远兵¹, 严义勇¹, 毕思远², 汪凤林^{1*}

(1. 深圳市易瑞生物技术有限公司, 广东深圳 518101; 2. 深圳市博英菲生物科技有限公司, 广东深圳 518102)

摘要 [目的]采用免疫胶体金技术,建立一种快速检测联苯菊酯的试纸条方法。[方法]利用有机合成方法制备了联苯菊酯半抗原,并与载体蛋白偶联得到免疫抗原,利用人工免疫的方法获得其单克隆抗体,通过酶联免疫法对制备的单克隆抗体的性能进行了验证。联苯菊酯胶体金层析试纸条是利用单克隆抗体标记胶体金,并将联苯菊酯抗原与羊抗鼠 IgG 分别喷制到硝酸纤维素膜上,与样品垫、吸水垫组装在 PVC 衬板上制备而成。[结果]联苯菊酯胶体金层析试纸条检测限为 500 ~ 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$,具有速度快、简单等优点。此外,该试纸条与大部分的拟除虫菊酯没有明显的交叉反应,利用该试纸条可实现对蔬菜中联苯菊酯添加试验的准确判定。[结论]胶体金试纸条方法具有前处理简单、检测速度快、可以肉眼判断结果等优点,该试纸条有望实现对果蔬中联苯菊酯残留的快速筛查。

关键词 联苯菊酯;单克隆抗体;胶体金;快速检测;免疫层析

中图分类号 TS207.5⁺3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)07-059-04

Development of Colloidal Gold Immunochromatographic Strip for Rapid Detection of Bifenthrin

ZHU Hai, XU Wen-jian, YANG Xing-xing, WANG Feng-lin^{*} et al (Shenzhen Yirui Biological Technology Co. Ltd., Shenzhen, Guangdong 518101)

Abstract [Objective] A rapid strip detection method for bifenthrin was established based on immune colloidal gold technology. [Method] The hapten of bifenthrin was prepared via organic synthesis method, and was conjugated with the carrier protein to obtain the antigen. Monoclonal antibody was obtained with the artificial immune method and its affinity was verified with the enzyme immunoassay. The colloidal gold immunochromatographic strip was prepared with monoclonal antibody conjugated gold colloid which is stored in microwells, and a PVC liner which is assembled with nitrocellulose membrane sprayed with bifenthrin antigen and goat anti-mouse IgG, sample pad and absorbent pad. [Result] The strip had a detection limit in the range of 500 ~ 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ with the advantages of fastness, easiness, etc. In addition, the strip did not cross-react with most of the pyrethroid pesticides. With the strip, the detection of bifenthrin in edible amaranth was accurately reported. [Conclusion] The colloidal gold strip method has advantages of simple pre-treatment, rapid detection and has potential of fast screening bifenthrin residues in fruits and vegetables.

Key words Bifenthrin; Monoclonal antibody; Colloidal gold; Rapid detection; Immunochromatography

联苯菊酯(Bifenthrin, BF)是一种人工合成的拟除虫菊酯类农药,具有杀虫谱广,击倒作用快,持效期长,强大的胃毒和触杀作用等特点^[1-2]。联苯菊酯已被广泛用于棉花、茶树、果树、蔬菜等农业害虫及白蚁、螨虫等卫生害虫的防治^[1]。联苯菊酯化学性质稳定,进入环境后不易被分解,其广泛使用容易导致较大残留。虽然联苯菊酯在人体内代谢快,不具有积累的危险,但研究表明,它具有神经毒害作用,通过影响动物的神经系统和离子通道活性,干扰神经系统的正常功能^[3-5]。因而,长期低剂量饮食含有联苯菊酯残留的初级农产品会对人类健康造成严重危害。世界卫生组织已将联苯菊酯归类为中等毒性/中度危害的类别。世界上多个国家包括中国、美国、加拿大等先后对农产品中联苯菊酯残留做了限量规定,其中,欧盟规定食品中联苯菊酯限量为 5.0 mg/kg,而我国规定了果蔬中联苯菊酯的残留限量为 5.0 ~ 10.0 mg/kg。联苯菊酯残留是我国农产品顺利出口的瓶颈,因而,发展快速检测联苯菊酯残留的方法对保证食品安全,确保我国农产品顺利出口具有重要意义。

目前对联苯菊酯的残留分析主要采用气相色谱法、气相

色谱-质谱联用法、气相色谱-质谱联用-负化学离子源法、高效液相色谱法、高效薄层色谱法等^[6-11]。仪器检测方法具有结果可靠准确、检测限低等优点,然而,仪器检测的方法,样品前处理繁琐、时间长,对于一些脂溶性含量较高的样品,提取之后,为了尽量减少其他杂质的干扰,一般需要经过固相萃取柱净化。王丽婷等利用超高效液相色谱及气相色谱-质谱联用测定茶叶中的联苯菊酯残留时,提取液先后经过了 2 种不同的氨基固相萃取柱的净化^[10]。另外,仪器检测的方法需要经过专业培训、有丰富经验的人员操作,仪器昂贵庞大,检测费用高,不适合批量样品的快速检测与现场检测。与仪器检测相比,酶联免疫分析方法是近年来发展起来的一种快速定量检测方法,它具有检测成本低,可同时实现对多个样品检测的优点。李波等利用间接竞争酶联免疫吸附的方法建立了定量测定方法用于快速测定^[9]。然而,酶联免疫方法依然需要有一定经验的专业人员操作,试验结果受外界因素(温度、离子强度等)及样品基质影响较大。与酶联免疫吸附的方法相比,胶体金免疫层析方法是一种更为简便、快速的检测方法^[12]。胶体金试纸条方法具有前处理简单、检测速度快、可以肉眼判断结果等优点。笔者利用胶体金层析的方法,通过抗原抗体的竞争反应,研制了一种快速检测果蔬中联苯菊酯残留的方法。

1 材料与方法

1.1 材料 主要仪器:IKA RV8 旋转蒸发仪,德国 IKA;加热搅拌器,河南爱博特科技发展有限公司;LC-MS^{QDESI} 液质联用仪,Applied Biosystems。主要试剂:功夫酸、联苯菊酯、1-乙

基金项目 深圳市科技创新委员会项目“食品安全快速检测技术工程中心”(GCZX20140509163151273);广东省科学技术厅项目“食源性致病菌磁性荧光纳米材料快速检测试剂盒和现场便携式手持检测仪研发”(2013B040402001)。

作者简介 朱海(1973-),男,广东深圳人,副研究员,博士,从事食品安全快速检测研究。*通讯作者,博士,从事农药残留快速检测研究。

收稿日期 2015-12-03

基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC)等,安耐吉公司;牛血清蛋白(BSA)、弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂,美国 Sigma 公司;吡啶、二氯甲烷、三氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、氯化亚砷(SOCl_2)等有机试剂,购自阿拉丁试剂有限公司。

1.2 联苯菊酯半抗原及抗原的合成 半抗原的合成路线如图 1 所示。称取 1.2 g 功夫酸(反应物 1),加入 8 mL SOCl_2 80 °C 回流 3.0 h,反应结束后将溶剂旋转蒸干,得到中间产物 1。在冰浴下,将溶有中间产物 1 的二氯甲烷溶液缓慢滴加至 20 mL 含有 1.0 g 反应物 2(联苯硝基化合物)的氯仿-吡啶(20:1, V/V)混合溶液中,室温反应 4 h,将溶剂蒸干,以正己烷-乙酸乙酯(6:1, V/V)为展开剂,过硅胶柱纯化,得到中间产物 2。

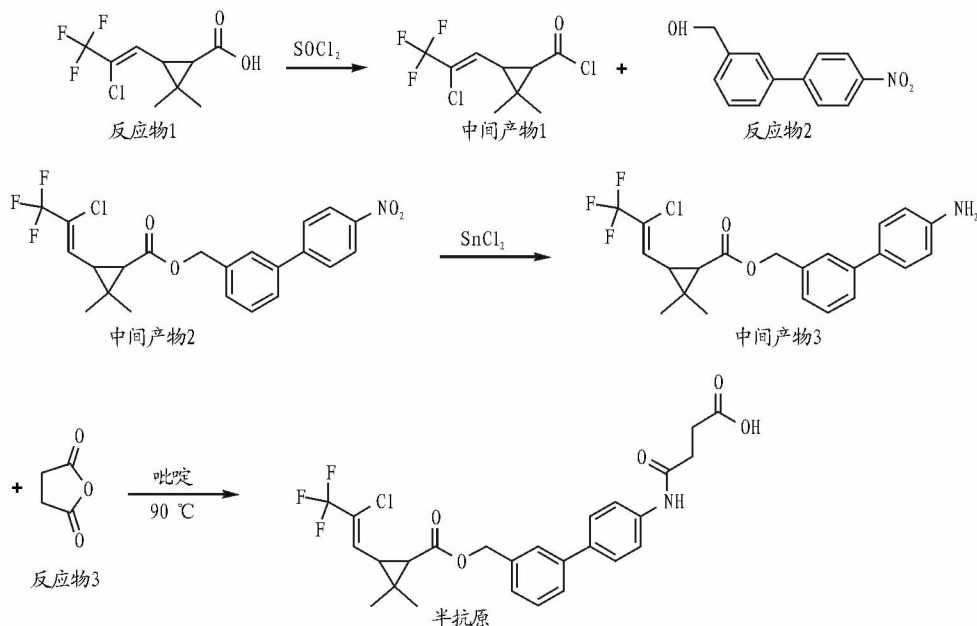


图 1 联苯菊酯半抗原的合成路线

Fig. 1 The synthesis route of bifenthrin hapten

1.3 单克隆抗体的制备及酶联免疫(ELISA)表征 利用人工抗原免疫方法,免疫 6~8 周的健康雌性 BALB/c 小鼠^[13]。简单介绍如下:首次免疫时,将 50 μg 人工抗原用弗氏完全佐剂乳化,第 2 次、3 次及第 4 次免疫时不完全佐剂乳化。每次间隔为 2~3 周。最后一次免疫 3 d 后,在无菌的条件下取出小鼠脾细胞,将其与骨髓瘤细胞 SP2/0 以 5:1 的数量比用聚乙二醇介导方法融合。将融合的细胞培养后利用有限稀释法通过间接竞争 ELISA 法选择单克隆抗体细胞株,并利用获得的细胞诱导小鼠产生腹水,通过饱和硫酸铵沉淀法纯化制得抗联苯菊酯的单克隆抗体。将纯化的单克隆抗体包被在酶联免疫底板上,利用酶联免疫的方法测定单克隆抗体的性能。

1.4 胶体金的制备 胶体金是利用柠檬酸钠还原氯金酸的方法制备而成^[14]。具体条件如下:在冷凝回流装置中的圆底烧瓶中加入 100 mL 超纯水和 1 mL 1% 的氯金酸溶液,加热至沸腾后加入 1 mL 1% 浓度的柠檬酸三钠溶液,煮沸 15

称取 1.2 g 中间产物 2,溶于无水乙醇中,加入 0.5 g 氯化亚锡,75 °C 回流 1.5 h 后,将蒸干溶剂用稀 NaOH 溶液将体系调成微碱性后用乙酸乙酯萃取,之后将有机相蒸干,以正己烷-乙酸乙酯(5:1, V/V)为展开剂,通过硅胶柱过柱纯化,得到中间产物 3。

将上述纯化好的中间产物 3 用无水吡啶溶解后,加入 1.0 g 丁二酸酐,室温搅拌 4.0 h,溶剂蒸干,萃取、过柱纯化后得到联苯菊酯的半抗原。

称取 20 mg 联苯菊酯半抗原用 2.5 mL DMF 溶解加入到溶有 100 mg BSA 的 5 mL 碳酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 9.0),之后加入 50 mg EDC,搅拌过夜后,将反应液在 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)中 4 °C 透析 24 h,去除未偶联的小分子化合物,得到联苯菊酯人工抗原,于 -20 °C 保存备用。

min 后,室温冷却即可。

1.5 胶体金标记抗体 分别向 4 个离心管里加入 0.9 mL 上述胶体金溶液,然后,分别加入 0.1 mL pH 为 7.5、8.0、8.4 与 9.0 的 Tris 缓冲溶液(1 mol/L),混匀后,加入 5 μL 0.1 mg/mL 联苯菊酯单克隆抗体。振荡均匀后,静置 10 min,观察胶体金是否团聚,选择标记抗体的最佳 pH。在最佳 pH 下,另向 4 个含有 1 mL 胶体金缓冲溶液的离心管中分别加入 3、6、9 与 12 μL 联苯菊酯单克隆抗体,考察检测限处的最佳抗体标记量。然后,进行放大标记。取 50 mL 胶体金,在合适的 pH 缓冲溶液里,加入合适体积的联苯菊酯单克隆抗体,混匀后,静置 30 min,然后加入 1% BSA 溶液,封闭 4.0 h,离心,复溶后得到胶体金标记联苯菊酯单克隆抗体,将其分装至反应杯里,冻干干燥保存备用。

1.6 联苯菊酯胶体金试纸条的制备 将联苯菊酯抗原用 0.01 mol/L PBS 稀释成 1.5 mg/mL。将羊抗鼠 IgG 用 0.01 mol/L PBS 稀释成 1 mg/mL。用 Biodot 喷膜机将二者以

1 μL/cm的速度喷于硝酸纤维膜上,分别形成检测线(T)和控制线(C),将喷制好的硝酸纤维膜置 37 ℃ 烤箱中干燥 16 h。然后,分别将干燥好的硝酸纤维素膜、吸水垫、样品垫依次粘贴在 PVC 衬板上,然后将其切割成 4 mm 等宽的试纸条备用。

1.7 试纸条检测限、交叉反应及实际样品的加标试验 试纸条检测限测试过程大致如下:首先用 0.1 mol/L Tris (pH 9.0) 缓冲液配制 0、500、800、1 000 μg/kg 标准品联苯菊酯溶液。取 3 批试纸条进行测试,每个浓度重复测定 5 次,以验证该试纸条的检测限。往反应杯中加入 200 μL 不同浓度的标准品溶液,混匀,室温孵育 6 min 后,插入试纸条,继续孵育 3 min,将试纸条移出微孔,除去下端样品垫,根据 T 线、C 线颜色强度差异判断试验结果。

对于交叉试验,分别考察常见类似农药顺-氯菊酯、胺菊酯、反-氯菊酯、氟氯氰菊酯、醚菊酯、溴氰菊酯、S-氰戊菊酯、氰戊菊酯,配制 5 mg/kg 上述相关溶液,加入反应杯,按照检测限测试相关步骤,考察试纸条与上述 8 种不同的农药的交叉反应情况,每种农药重复测定 5 次,判断试纸条的特异性。

对于实际样品的标准品加标试验,以苋菜为例进行测试。首先,称取 2 份 2.0 g 新鲜苋菜,用食物搅拌机粉碎,分别加入 100 μL 0 mg/kg 联苯菊酯标准溶液或 8 mg/kg 联苯菊酯标准溶液,混匀,加入 9.9 mL 0.1 mol/L Tris (pH 9.0) 与 10% 甲醇溶液,高速匀质 2 min 提取,静置 5 min 后,取 200 μL 上清至反应杯,混匀,按上述检测限试验进行测定与判断,对照试验与加标试验分别重复 20 次。

2 结果与分析

2.1 半抗原及抗原的合成 联苯菊酯的合成路线如图 1 所示,反应物 1 与氯化亚砷反应得到其酰氯中间产物 1,通过与联苯醇硝基化合物(反应物 2)反应获得淡黄色结晶化合物,中间产物 2,将其硝基还原后获得氨基化合物中间产物 3,然后通过丁二酸酐反应获得联苯菊酯半抗原。图 2 为联苯菊酯半抗原的质谱图,质荷比 522 处的母离子峰可判断所制备的产物为联苯菊酯的衍生物(半抗原)。半抗原与载体蛋白 BSA 的偶联是利用碳二亚胺法^[15-16]。

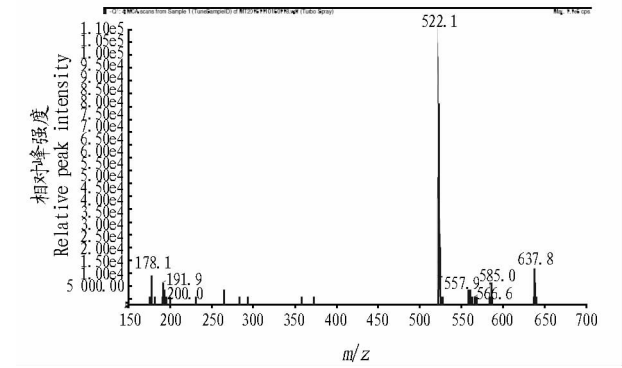


图 2 半抗原的质谱

Fig. 2 The mass spectrum of hapten

2.2 联苯菊酯抗体的 ELISA 验证 为了验证纯化后抗体与联苯菊酯结合的能力,利用酶联免疫的方法进行了验证。图 3 是获得的联苯菊酯 ELISA 标准曲线图,从图 3 中可以得出,联苯菊酯抗体对联苯菊酯从 10 ~ 810 μg/kg 具有良好的线性范围。试验结果表明,通过该方法制备的联苯菊酯单克隆抗体对联苯菊酯具有高灵敏度,因而,利用该单克隆抗体制备的快速检测试纸条,有望实现对联苯菊酯的快速高灵敏检测。

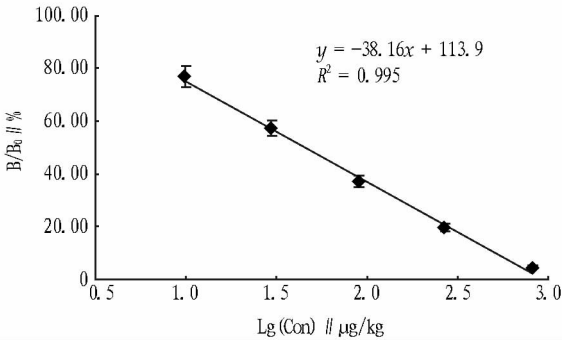


图 3 联苯菊酯 ELISA 标准曲线

Fig. 3 The ELISA standard curve of bifenthrin

2.3 胶体金标记联苯菊酯单克隆抗体 胶体金是利用柠檬酸钠还原氯金酸的方法制备而成^[14,17]。此方法制备的胶体金为酒红色溶液,粒径约为 40 nm,最大吸收峰在 526 nm 处。对于标记的最优 pH 的确定,按照“1.5”中介绍的方法,获得标记的最优条件为 pH 9.0 Tris 缓冲溶液(0.1 mol/L),抗体与胶体金的最佳比例为 6 μg 抗体/mL 胶体金。在此条件下,相同量的抗体所获得的胶体金联苯菊酯单克隆抗体复合物最稳定,没有出现团聚现象。因而,该试验采用 pH 9.0 Tris 缓冲溶液(0.1 mol/L),6 μg 抗体/mL 胶体金进行标记。

2.4 联苯菊酯试纸条的检测限 图 4 是利用制备的联苯菊酯试纸条,对不同浓度的联苯菊酯重复 5 次检测的一组代表性结果。从图 4 中可以看出,当联苯菊酯的浓度分别为 0、500、800 以及 1 000 μg/kg 时,试纸条中 T 线的颜色逐渐变弱,而 C 线的颜色逐渐增加。当联苯菊酯的浓度为 0 μg/kg 时,T 线强度明显强于 C 线强度,检测结果为阴性;当联苯菊酯的浓度为 500 μg/kg 时,T 线强度与 C 线强度相当,结果为弱阳性;当联苯菊酯的浓度为 800 μg/kg 时,T 线强度比 C 线强度弱,结果为阳性;当联苯菊酯的浓度为 1 000 μg/kg 时,T 线基本消失,结果为强阳性。该结果表明,试验研制的试纸条对联苯菊酯的检测限为 500 ~ 800 μg/kg,试验结果重复性好。



图 4 联苯菊酯检测限结果

Fig. 4 The detection limit results for bifenthrin

2.5 交叉反应 表 1 是试纸条分别对 5 mg/kg 的 8 种农药重复 5 次测试的结果。从表 1 中可以看出,试纸条对 8 种农药重复 5 次试验的结果均为阴性。该结果表明,试纸条对 8 种不同的农药(5 mg/kg)没有交叉反应。这 8 种农药的结构与联苯菊酯非常类似,因而证明该试纸条具有良好的特异性。

表 1 交叉反应试验结果
Table 1 Cross-reaction test results

名称 Name	阴性结果次数 Negative times	阳性结果次数 Positive times
顺-氯菊酯 Cis-cyermethrin	5	0
胺菊酯 Tetramethrin	5	0
反-氯菊酯 Trans-cyermethrin	5	0
氟氰菊酯 Cyfluthrin	5	0
醚菊酯 Ethofenprox	5	0
溴氰菊酯 Deltamethrin	5	0
S-氰戊菊酯 A-fenvalerate	5	0
氰戊菊酯 Fenvalerate	5	0

2.6 实际样品的加标试验 表 2 为将新鲜苋菜粉碎后,加入联苯菊酯标准品,利用提取液提取后,直接用试纸条进行重复 20 次检测的试验结果。从表 2 中可以得出,没有加入联苯菊酯的对照试验中,20 次的检测结果均为阴性,而当提取液中浓度为 800 μg/kg 的联苯菊酯时,20 次检测的结果均为阳性。该结果表明,该试纸条能够对浓度为 800 μg/kg 的联苯菊酯进行准确报阳,检测结果可靠,重现性好。因而,该试纸条有望对果蔬中的农药残留进行快速筛查。

表 2 苋菜加标试验结果

Table 2 Detection results of standard addition of bifenthrin into edible amaranth

类别 Type	阳性结果次数 Positive times	阴性结果次数 Negative times
对照组 Control	0	20
加标组(最终浓度 800 μg/kg)	20	0
Standard addition (final concentration: 800 μg/kg)		

3 结论

该研究利用有机合成的方法制备了联苯菊酯的半抗原,通过人工免疫小鼠的方法制备了对联苯菊酯具有高特异性识别能力的单克隆抗体。试验将制备的单克隆抗体标记到胶体金表面,分装至微孔反应杯冻干。将联苯菊酯抗原与羊

抗鼠二抗喷涂在硝酸纤维素膜后,将样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫依次黏附在 PVC 地板制备了联苯菊酯快速检测试纸条。该试纸条的检测限为 500 ~ 800 μg/kg,能满足欧盟及我国对联苯菊酯限量的规定。该方法快速,操作简单,无需复杂前处理过程,有望对果蔬中联苯菊酯残留进行现场快速筛查。

参考文献

[1] 邓明学,谭有龙,唐美欣,等. 联苯菊酯等 6 种农药对柑桔木虱成虫室内毒力测定及田间药效试验[J]. 中国农学通报,2009(15):169-173.

[2] 王爱芬,李小鹰. 联苯菊酯的应用开发研究综述[J]. 白蚁科技,2000(2):3-10.

[3] WOLANSKY M J,MCDANIEL K L,MOSER V C,et al. Influence of dosing volume on the neurotoxicity of bifenthrin[J]. Neurotoxicology and teratology,2007,29(3):377-384.

[4] 吕晓静,于维森,崔静. 茶叶中联苯菊酯气相色谱质谱法的测定及其对小鼠毒性试验的结果[J]. 职业与健康,2014(4):456-458.

[5] CAO Z,CUI Y,NGUYEN H M,et al. Nanomolar bifenthrin alters synchronous Ca^{2+} oscillations and cortical neuron development independent of sodium channel activity[J]. Molecular pharmacology,2014,85(4):630-639.

[6] 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[J]. Analytical and bioanalytical chemistry,2003,376(4):502-511.

[7] HUA X,LIU X,YIN W,et al. A sensitive monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bifenthrin in a chemical soil barrier[J]. Science of the total environment,2015,502:246-251.

[8] 樊玮,汤锋,岳永德. 高效薄层色谱法分析茶叶中高效氯氟氰菊酯和联苯菊酯农药残留[J]. 分析仪器,2010(2):36-39.

[9] 李波,施海燕,王鸣华. 联苯菊酯酶联免疫吸附分析方法研究[J]. 分析化学,2008(1):34-38.

[10] 王丽婷,王波,周围,等. 超高效合相色谱及气相色谱-质谱联用测定茶叶中联苯菊酯[J]. 分析化学,2015(7):1047-1052.

[11] 董振霖,杨春光,薛大方,等. 气相色谱-质谱法测定植物源性食品中残留的联苯菊酯[J]. 色谱,2009(1):82-85.

[12] 李月明. 双酚 A 单克隆抗体制备及胶体金免疫层析试纸条的研制[D]. 广州:广东工业大学,2012.

[13] CARROLL F I,ABRAHAM P,GONG P K,et al. The synthesis of haptens and their use for the development of monoclonal antibodies for treating methamphetamine abuse[J]. Journal of medicinal chemistry,2009,52(22):7301-7309.

[14] TURKEVICH J,STEVENSON P C,HILLIER J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold[J]. Discussions of the faraday society,1951,11:55-75.

[15] LIU W,HOWARTH M,GREYTAKE A B,et al. Compact biocompatible quantum dots functionalized for cellular imaging[J]. Journal of the American chemical society,2008,130(4):1274-1284.

[16] BARTCZAK D A G. Kanaras, preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/Sulfo-NHS coupling[J]. Langmuir,2011,27(16):10119-10123.

[17] MIESZAWSKA A J,MULDER W J M,FAYAD Z A,et al. Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease[J]. Molecular pharmaceutics,2013,10(3):831-847.

[27] 国家烟草专卖局. 烟用丝束理化性能的测定 第 1 部分:丝束线密度:YC/T 169.1—2009[S]. 北京:中国标准出版社,2009.

[28] 王雪丽,赵铭钦,任伟,等. 浓香型烟产区烟叶风格特征因子分析[J]. 浙江农业科学,2014(3):328-331.

[29] 钱丽丽,李平惠,杨义杰,等. 不同产地芸豆中矿物元素的因子分析与聚类分析[J]. 食品科学,2015,36(14):102-106.

[30] 张朝,葛少林,余世科,等. 基于因子分析的烤烟主要化学成分特性[J]. 湖南文理学院学报(自然科学版),2015(2):84-87.

(上接第 51 页)

[24] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准管理委员会. 卷烟和滤棒物理性能的测定第 2 部分:长度 光电法:GB/T 22838.2—2009[S]. 北京:中国标准出版社,2009.

[25] 赵亮,徐玉中,应伟,等. Image-Pro Plus 技术在沟槽滤棒特征参数测量中的应用[J]. 烟草科技,2015(2):85-90.

[26] 国家烟草专卖局. 烟用丝束理化性能的测定 第 2 部分:单丝线密度:YC/T 169.2—2009[S]. 北京:中国标准出版社,2009.