

2,4-D 人工抗原合成及 2,4-D 类农药特异性多克隆抗体的研制

王升吉, 尚佑芬, 赵玖华, 杨崇良, 路兴波, 孙红炜

(山东省农业科学院植物保护研究所, 山东 济南 250100)

摘要:通过改良 EDC 法,将 2,4-DB、2,4-D 分别与载体蛋白(BSA、OVA)偶联合成了 2,4-D 的免疫原 2,4-DB-BSA、2,4-D-BSA 和包被原 2,4-DB-OVA、2,4-D-OVA。免疫抗原测定结果表明,所得紫外吸收光谱,具有载体蛋白 BSA 和半抗原 2,4-DB 或 2,4-D 的特性,最大吸收峰为 282 nm。合成 2,4-DB-BSA、2,4-D-BSA 免疫抗原的结合比分别为 1:24、1:20,合成的 2,4-DB-OVA、2,4-D-OVA 包被原的结合比分别为 1:10、1:8。上述两种免疫原分别免疫新西兰白雄兔,获得 2,4-D 类农药多克隆抗体。其中免疫 2,4-DB-BSA 的两只兔 PBD1 和 PBD2 的效价较高,分别是 1:102 400 和 1:51 200。选择效价较高的 PBD1 多克隆抗体进一步优化筛选出抗原抗体的工作浓度,2,4-D-OVA 包被原 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,PBD1 多克隆抗体 1:12 800。经测定,该多克隆抗体对目标检测物 2,4-D、2,4-D butyl ester 敏感度较高,抑制中浓度(I_{50})、检测限(I_{20})分别为,2,4-D:179.8 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,1.09 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$;2,4-D butyl ester:3 010.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,1.53 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。对 2,4-D 识别的特异性也较强。另外测定了制备 2,4-D 多克隆抗体对几种 2,4-D 类似结构化合物交叉特异性反应,2,4-DB 最强,2,4-D 次之,之后依次为 2,4-D 丁酯、2,4-D 异丙酯,交叉反应性较差的有 2 甲 4 氯、2,4,5-涕、2,4-滴丙酸。

关键词:2,4-D;半抗原;免疫抗原;酶联免疫吸附测定(ELISA);抗体

中图分类号:X592 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)05-2052-06

Synthesis of the Antigens for 2,4-D Type and Development of Its Specific Polyclonal Antibody

WANG Sheng-ji, SHANG You-fen, ZHAO Jiu-hua, YANG Chong-liang, LU Xing-bo, SUN Hong-wei

(Institute of Plant Protection, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

Abstract:2,4-DB, 2,4-D, as two haptens, were conjugated to bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) with improved EDC method, two immunogens of 2,4-DB-BSA, 2,4-D-BSA and two coating antigens of 2,4-DB-OVA, 2,4-D-OVA were obtained. The characteristics in ultraviolet absorption spectrum of immunogen possessed those of both carrier protein and haptens, the location of the absorption peak was at 282 nm, same as that of hapten, 2,4-D. The reaction ratios of 2,4-DB-BSA and 2,4-D-BSA were 1:24 and 1:20 respectively. Those of 2,4-D-OVA and 2,4-DB-OVA, were 1:10 and 1:8. The specific polyclonal antibody for 2,4-D were obtained by immunizing New Zealand male white rabbits with the two antigens. Two rabbits PBD1 and PBD2 were immunized with 2,4-DB-BSA, produced high titers of polyclonal antibody (antisera) as follows, 1:102 400 and 1:51 200 respectively. The PBD1 polyclonal antibody was selected to next study. Work concentration of antigens was 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the PBD1 polyclonal antibody was 1:12 800. The polyclonal antibody to 2,4-D, 2,4-D butyl ester had high sensibility. The midmost inhibitory concentration (I_{50}) and the detection limit (I_{20}) of 2,4-D were 179.8 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 1.09 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, and those of 2,4-D butyl ester were 3 010.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 1.53 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. The peculiar cross-reactivity of the polyclonal antibody against 2,4-D analogous compounds were also tested, the sensibility to 2,4-DB was highest, then 2,4-D, 2,4-D butyl ester, and 2,4-D isopropyl ester, but the sensibility to MCPA, 2,4,5-T, Dichlorprop were lower.

Keywords:2,4-D; hapten; immunogen; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); antibody

2,4-D 类农药是在生产上广泛使用的除草剂和

植物生长调节剂,例如 2,4-D(2,4-滴或 2,4-二氯苯氧乙酸),在农产品、水和土壤中的残留危害不容忽视,如其在土壤、水中残留超标,易引起棉花、某些蔬菜、林木的毒害,对人类的健康造成较大危害,据报道,2,4-D 具潜在的致癌性,对免疫系统及生育系统有不良影响,还对眼睛、皮肤、肝、心脏等有损害^[1-3]。鉴

收稿日期:2007-10-23

基金项目:山东省自然科学基金项目(Y2006D32)

作者简介:王升吉(1963—),男,山东平度市人,硕士,研究员,主要从事植物病理学和农药残留、环境安全研究。

E-mail: shjiw@163.com

于此, 国际组织在环境标准中对 2,4-D 做出了严格的规定, 世界卫生组织 2003 年 8 月颁布《饮用水水质指南》, 规定饮用水中 2,4-D 的最大检出浓度为 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1[4]}$, 我国 2001 年颁布的《饮用水水质卫生规范》的非常规检测中, 将 2,4-D 的限制规定为 $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1[5]}$ 。我国强制性国家标准规定蔬菜和原粮中 2,4-D 的最高残留分别是 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1[6]}$ 。2,4-D 传统检测主要是气相色谱技术(GC), 该方法检测过程繁复、耗时长、结果的一致性较差。随着待检样品、特别是要求快速获取检测结果样品量的迅速增加, 迫切需要探索、应用高效率检测分析技术, 而 ELISA 技术即有快速、灵敏度高、特异性强等优点, 已较多应用于农药、激素、毒物等残留、环境污染物的快速检测, 引起越来越广泛的关注^[7-9]。

ELISA 检测技术的关键是获得对农药分子具高特异性和亲和力的抗体, 为此, 需首先制备出具有高免疫原性和特异性的人工抗原。人工抗原的制备包括两步: (1) 合成保留农药分子结构且带活性基团的半抗原; (2) 使半抗原的活性基团与白蛋白、卵清蛋白等载体蛋白反应, 得到抗原。对 2,4-D 而言, 因 2,4-D 分子本身(或其有关衍生物如 2,4-DB) 含有反应活性基团, 人工抗原合成所需半抗原可方便选择 2,4-D 本身, 因此, 其免疫活性高的人工抗原的获得也就只决定于半抗原与载体蛋白反应了。参考国内外曾有的 2,4-D 抗体制备报道^[10-15] 选择 2,4-D 本身作为半抗原, 笔者对 2,4-D、2,4-DB(2,4-滴丁酸, 2,4-二氯苯氧丁酸) 分子结构比较看出, 二者分子结构类似, 都具类似苯环的官能团和做为活性基团的羧基, 但 2,4-DB 结构较 2,4-D 具较长碳链间隔臂(增加 2 个碳的碳链长), 更易使半抗原的分子独特部位暴露(即突出抗原决定簇)而增强免疫性, 因此本研究选择 2,4-DB 为合成人工免疫抗原的半抗原, 并进行了 2,4-D 类农药抗体制备及其检验系统研究。

1 材料与方法

1.1 试剂

2,4-滴丁酸(2,4-DB)原药(购自南京达能科技有限公司), 2,4-滴(2,4-D), 1-乙基 3-(二甲胺基)丙基碳二亚胺盐酸盐(EDC), N-羟基硫代琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)(购自上海延长生化科技发展有限公司), BSA(牛血清白蛋白, MW67000), 卵清蛋白(OVA, MW45000), 二甲基亚砜(DMSO), N,N-二甲基甲酰胺(DMF)(购自上海志壮生物科技有限公司), 酶标

二抗(辣根酶标记山羊抗兔 IgG)(购自北京中杉金桥生物技术有限公司), 弗氏完全佐剂(FCA), 弗氏不完全佐剂(FIA)(Sigma 公司产品); 磷酸氢二钠, 磷酸二氢钠, 碳酸钠, 碳酸氢钠, 氯化钠, 柠檬酸, 邻苯二胺, 双氧水, 明胶, 氢氧化钠, 盐酸, 硫酸等均为 AR 级。

1.2 材料和器材

材料: 96 孔聚乙烯酶标板、透析袋(允许透过分子量 < 6 000), 塑料一次性注射器(5 mL、2.5 mL)、试验动物为体重 1.5 kg 新西兰雄性白兔(购自本院畜牧所养兔室)。

仪器: 紫外分光光度计(Beckman DU600), 酶标仪(TECAN A-5082), 高速冷冻离心机(Beckman A-VANTIM-30I), 磁力搅拌器, 旋涡混合器, 电子分析天平(十万分之一), 玻璃注射器(10 mL), 金花牌多吸头点样器, 各规格的移液枪, Thermo 洗板机。

1.3 试验方法

1.3.1 人工抗原的合成

采用改良 EDC 法进行人工抗原的偶联合成^[16]。首先是人工免疫抗原的制备, 分别称取 2,4-DB、2,4-D 各 120 mg, 两种试剂分别进行以下各操作, 加 24 mL $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PB(调 pH 11 以上)溶解, 之后用 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 调回 pH 7.2, 加 120 mg Sulf-NHS, 充分混匀, 使其溶解, 静置 5 min, 加入 180 mg EDC, 充分混匀, 室温静置 5 min。另将 120 mg BSA 溶解到 18 mL 超纯水中, 并将上述反应液缓慢滴加到该 BSA 溶液中(约 1 h), 置 4 ℃ 搅拌过夜, 反应完成后, 装入透析袋, 以 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液透析, $8 \text{ h} \cdot \text{次}^{-1}$, 共透析 8 次, 直至透析外液中测不出半抗原 2,4-DB 的紫外吸收特征。精确计量透析袋内 2,4-DB-BSA 或 2,4-D-BSA 偶联物的体积, 并用紫外扫描法测定和计算偶联物的结合比, 得到两者适当结合比的偶联物, -20 ℃ 冻存。制备免疫抗原同时, 进行人工包被抗原的合成, 分别以 2,4-DB、2,4-D 为半抗原, 卵清蛋白 OVA 为载体蛋白, 制备包被原 2,4-DB-OVA、2,4-D-OVA, 制备方法与免疫原相同。

1.3.2 半抗原与载体蛋白偶联率的计算方法

参照吕会田等方法^[17](以 2,4-DB-BSA 为例)。具体方法如下: (1) 称量 2,4-DB 20 mg, 溶于 20 mL $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 中, 取 1 mL 进行倍比稀释, 依次得 1 000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.812 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 系列浓度, 分别做紫外图谱的扫描。(2) 紫外光谱图上, 做 2,4-DB 浓度对吸光度的标准吸收曲线 $\text{OD}_{\lambda_{2,4-DB}}-2,4-DB$, 读取 2,4-DB 最大吸收峰处的吸光度 $\text{OD}_{\lambda_{\text{max}}, 2,4-DB}$ 。

(3)按同样做法,称量 BSA 20 mg,溶于 20 mL 0.05 mol·L⁻¹ PBS 中,配制倍比稀释液,依次进行紫外扫描,做 BSA 的紫外光谱图,读出其最大吸收峰处的 OD_{λmaxBSA○}。(4)透析后的偶联物溶液稀释 10 倍,测其 UV 图谱,获得 BSA 浓度对吸光度的标准吸收曲线 OD_{λBSA}-BSA 和其在 λ_{max} 处的吸光值 OD_{λmax 偶联物○}。(5)近似认为 BSA 在反应和透析过程中不发生分解和损失,可根据体积比计算出偶联物溶液中 BSA 浓度 C_{BSA},将其插入 OD_{λBSA}-BSA 标准吸收曲线的趋势线公式,计算得纯 BSA 应有的吸光值 OD_{λmaxBSA○}。(6)按照吸光值的可叠加原理,得偶联物中 2,4-DB 对总吸光值的贡献 OD_{λmax2,4-DB} 应为:OD_{λmax2,4-DB}=OD_{λmax 偶联物}-OD_{λmaxBSA},由此吸光值所对应 OD_{λmax2,4-DB}-2,4-DB 标准吸收曲线,即可算出 2,4-DB 在偶联物中的浓度 C_{2,4-DB○}。(7)将 BSA 及 2,4-DB 的质量浓度转换为摩尔浓度,二者的比值即为偶联比。

1.3.3 动物免疫

获得的人工抗原免疫新西兰白雄兔,每种免疫原免疫 2 只兔,采用背部皮下多点法注射。先进行基础免疫,免疫剂量为 0.9 mg·兔⁻¹,免疫原用生理盐水稀释,加等体积的佛氏完全佐剂充分乳化后注射,之后进行 5 次加强免疫,免疫剂量为 0.45 mg·兔⁻¹,佐剂为佛氏不完全佐剂,每次免疫的时间间隔均为 2 周。最后一次免疫后 10 d 采血,以 ELISA 法测定抗血清的效价,待抗血清达到一定效价后,采取兔心脏采血法获取血液,析出抗血清加入 0.01% 硫柳汞,分装后于 -20 °C 冻存,备 ELISA 抗体效价和亲合性、特异性的测定。

1.3.4 抗体的鉴定

1.3.4.1 酶联免疫吸附法(ELISA)基本条件的建立

用 0.1 mol·L⁻¹ pH 9.6 的碳酸盐缓冲液将包被原稀释成不同浓度后包被在 96 孔酶标板上,100 μL·孔⁻¹,4 °C 过夜孵育,PST 洗涤 3 次;用 1% OVA 150 μL·孔⁻¹ 封闭,37 °C 培养箱孵育 2 h,再洗涤 3 次(PST,下同,每步均洗涤);加入经 PBST 稀释的系列抗血清浓度 100 μg·孔⁻¹,免疫前血清为阴性对照,以反应稀释液为空白对照,37 °C 孵育 2 h;加入经 PBST 稀释 5 000 倍的羊抗兔 IgG-HRP 液,100 μL·孔⁻¹,37 °C 孵育 1 h;最后加入邻苯二氨底物溶液,37 °C 孵育 15 min,显色,加入 2 mol·L⁻¹ 的硫酸终止反应,50 μL·孔⁻¹。经酶标仪测定各孔的 OD₄₉₀ 值。据此方阵排列,选择出间接 ELISA 反应抗原抗体的工作浓度,即 OD₄₉₀ 为 1.0 左右,抗原抗体用量较少时抗原抗体的浓度。

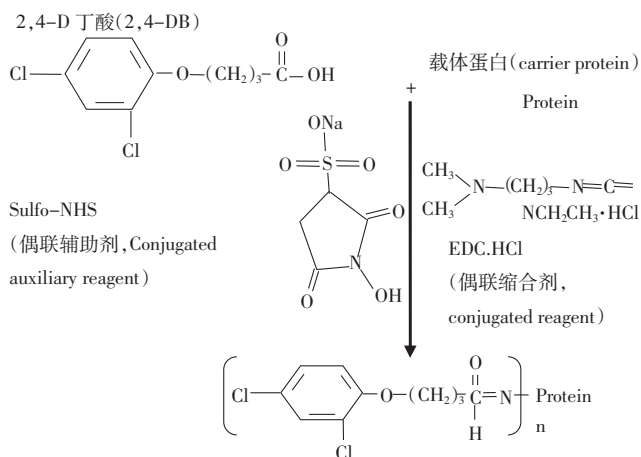
1.3.4.2 抗体亲合性和特异性

利用间接竞争 ELISA 反应测定抗体对 2,4-D、2,4-D butyl ester (2,4-滴丁酯)、2,4-DB 的敏感性,抗原抗体选择已优化的工作浓度。用 0.02 mol·L⁻¹ PBST 将 2,4-D、2,4-D butyl ester、2,4-DB 分别稀释(按 1/10 倍)为 10³、10²、10¹……10⁻⁴、10⁻⁵ μg·mL⁻¹ 的标准液,并与抗体工作浓度液等体积预混过夜,同时以 0.02 mol·mL⁻¹ PBST 与抗体稀释液预混液做阳性对照。按预设布局点样上述各农药与抗体预混液于酶联板上,其他各步与常规 ELISA 步骤相同。预混液中的各农药小分子,与包被抗原竞争结合有限的抗体,农药溶液浓度越高,抗体与包被抗原结合越少,从而显色越浅,再与对照比较,测定 2,4-D、2,4-D butyl ester 对抗原抗体结合反应的抑制率(I),以 I 为纵座标,2,4-D(或 2,4-D butyl ester)浓度的 lg 值(lgC)为横座标,建立农药标准抑制曲线、回归方程,计算出抑制中浓度(I₅₀)、检测限(I₂₀)及抗体与 2,4-D 结构类似化合物的交叉反应率(CR)。

2 结果与分析

2.1 人工抗原的合成与鉴定

在改良 EDC 法中,2,4-DB、2,4-D 分别与 BSA 按一定比例通过偶联缩合剂 EDC 和偶联辅助剂 N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)共同作用下,偶联形成 2,4-DB-BSA 和 2,4-D-BSA 二种免疫人工抗原。2,4-DB、2,4-D 分别与 OVA 通过同样反应形成 2,4-DB-OVA 和 2,4-D-OVA,即人工包被抗原。



免疫人工抗原经测定所得紫外吸收光谱(图 1),具有载体蛋白 BSA 和半抗原 2,4-DB 或 2,4-D 的特性,摩尔吸光系数明显增加,半抗原 2,4-DB 或 2,4-D 与 BSA 分别在 282 nm 和 277 nm 处有最大吸收峰,而

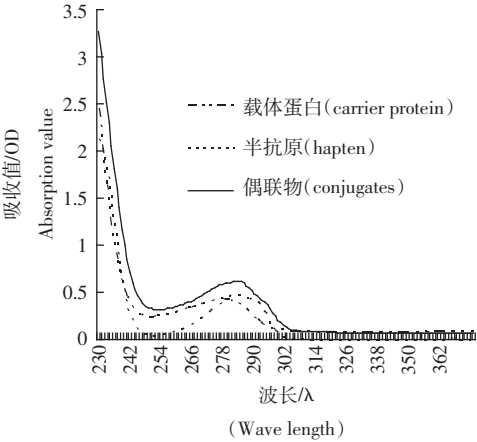


图 1 人工免疫抗原 2,4-DB-BSA 紫外吸收光谱
Figure 1 UA spectrum of artificial immunogen,2,4-DB-BSA

偶联物(2,4-DB-BSA 和 2,4-D-BSA)最大吸收峰为 282 nm,与半抗原 2,4-D 的相同,这可能是由于该半抗原最大吸收处 282 nm 紫外吸收较载体蛋白 BSA 的最大吸收处 277 nm 的紫外吸收强许多(>10 倍)造成的,两者结合后吸收峰叠加即造成这种现象。因此推测半抗原与载体蛋白发生偶联。根据偶联物在紫外区域的吸收约等于游离蛋白和半抗原吸光值的简单相加,可以通过在 282 nm 的吸收值,推算其结合比。经计算,合成 2,4-DB-BSA、2,4-D-BSA 免疫抗原的结合比分别为 1:24、1:20,合成的 2,4-DB-OVA、2,4-D-OVA 包被抗原的结合比分别为 1:10、1:8。

2.2 抗体的效价

采用间接 ELISA 法测定制备 2,4-D 多克隆抗体(抗血清,下同)的效价,以大于阴性血清吸光度值 2.1 倍(PN>2.1)时的多克隆抗体最大稀释度作为效价,包被原 2,4-D-OVA 浓度分别设 3、1.5、0.75、0.375 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,测定多克隆抗体效价,免疫 2,4-DB-BSA 的两只兔 PBD1 和 PBD2 分别为 1:102 400 和 1:51 200(图2);免疫

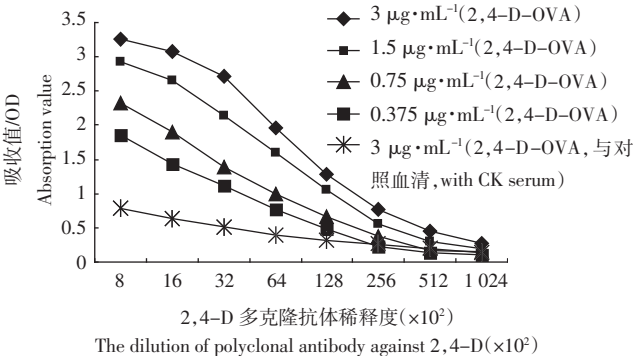


图 2 2,4-D 多克隆抗体(兔 PBD1 抗血清)效价曲线
Figure 1 The titer curve of polyclonal antibody for 2,4-D (Rabbit PBD1 antiserum)

2,4-D-BSA 的两只兔 PD1 和 PD2 分别是 1:25 600 和 1:12 800。选择效价较高的 PBD1 多克隆抗体,进一步优化 ELISA 反应,筛选出抗原抗体工作浓度,2,4-D-OVA 包被原 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,PBD1 多克隆抗体 1:12 800。

2.3 抗体的敏感度、特异性

根据 2.2 所确定的抗原抗体工作浓度,以间接 ELISA 法,测定制备的 2,4-D 多克隆抗体对目标分析物 2,4-D、2,4-D butyl ester 的敏感度,测定结果以抑制率(I)为纵座标,2,4-D、2,4-D butyl ester(或 2,4-DB)浓度的 lg 值(lgC)为横座标,绘制出标准抑制曲线(图 3)呈典型的 S 型曲线。在 2,4-D、2,4-D butyl ester(或半抗原 2,4-DB)抑制浓度 $10^{-4}\sim 10^1$ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内,抑制率(I)与浓度的 lg 值(lgC)线性相关,线性回归方程分别为,2,4-D: $I=13.54\lg C+60.09$, $R^2=0.993\ 9$;2,4-D butyl ester: $I=13.08\lg C+56.82$, $R^2=0.997\ 5$; 半抗原 2,4-DB: $I=13.88\lg C+64.55$, $R^2=0.993\ 9$; 根据回归方程,计算获得 2,4-D、2,4-D butyl ester、2,4-DB 对抗原抗体反应抑制 50%和 20%所需浓度($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)即 I_{50} 和 I_{20} (检测限)分别为,2,4-D:179.8 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,1.09 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$;2,4-D butyl ester:3 010.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,1.53 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$;半抗原 2,4-DB:89.48 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,0.62 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,对 2,4-D 识别的灵敏度较高。该多克隆抗体的制备工作丰富了国内、外农产品和环境 2,4-D 类农药残留免疫分析检测研究领域内容,进一步试验可为研制成 2,4-D 检测 ELISA 试剂盒奠定基础。

另外测定了制备 2,4-D 多克隆抗体对几种 2,4-D 类似结构化合物特异性反应(表 1),以交叉反应率(CR)衡量,发现半抗原 2,4-DB 与抗体的亲合力最强,CR 为 200.9,高于 2,4-D 对抗体的亲合力,这是因为半抗原 2,4-DB 更突出了 2,4-D 分子特异性部位。与半抗原 2,4-DB 结构差异越大的化合物,交叉反应性越小,表中 2,4-滴丁酯、2,4-滴异丙酯与抗 2,4-DB-BSA 抗体的交叉反应性较强,可能由于结构中形成酯键的影响,2,4 二氯苯酚与该多克隆抗体的交叉反应性也较强,可能是由于该化合物结构和 2,4-D 的独特性部位(抗原决定簇)相吻合,从而利于与该抗体的识别;该多克隆抗体与 2 甲 4 氯、2,4,5-涕的交叉反应性较小,可能由于苯环上取代基数量或种类变化等削弱了其与抗体的识别能力;该多克隆抗体与 2,4-滴丙酸的交叉反应性也较小,原因可能与 2,4-D、2,4-DB 相比,其结构上与苯氧基相连的 C 原子上由一个甲基取代而造成此处电荷、电子云密度的变化,进而造成电免疫原性的变化,也就是说,与苯氧

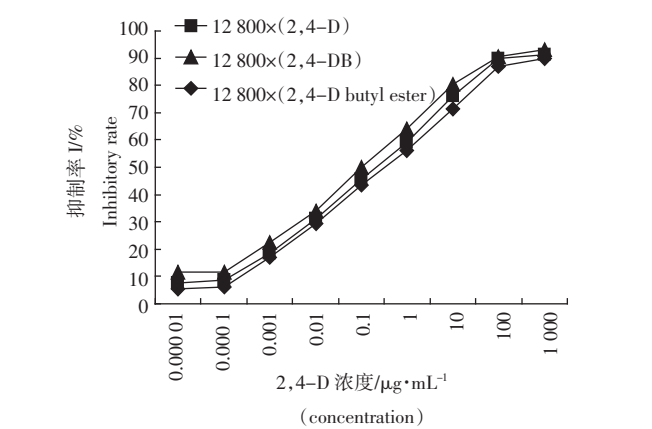


图 3 2,4-D、2,4-D 丁酯标准抑制曲线

Figure 3 The standard inhibition curve for 2,4-D,2,4-D butyl ester

基相连的碳原子结构是-CH₂-还是-CH(CH₃)-,也会对抗原激活免疫系统产生抗体过程造成影响。

3 讨论

获得效价高、特异性强的抗体是建立免疫学分析方法的关键。而农药多为小分子化合物,抗体制备往往较困难。半抗原的结构特征、与载体蛋白的偶联结合位点、连接臂长度及偶联结合比均影响制备抗体的灵敏度和特异性。本研究分别用 2,4-DB 和 2,4-D 与

载体蛋白偶联,获得了连接臂长度不同的偶联物,结果表明连接臂较长的免疫原所产生抗体效价和特异性均较高,利于分子结构特征充分暴露。施海燕等曾在 2 甲 4 氯(MCPA)基团上分别连接了氨基丁酸、氨基己酸,得到两种具有不同臂长的半抗原分子,将 MCPA 及得到的两种半抗原分子分别与载体蛋白 BSA 偶联合成了免疫抗原,经过动物免疫获得的 3 种相应多克隆抗体,分别测定效价,结果也是连接臂较长的免疫抗原所产生的抗体效价最高^[18]。

选择的半抗原 2,4-DB、2,4-D 不溶于水,对其溶解方法不同,会影响人工抗原的合成效果,最终影响 2,4-D 多克隆抗体的制备效果。本文作者曾做过用不同方法溶解 2,4-DB、2,4-D 的比较:二种溶解方法,以有机溶剂 DMF 助溶和以强碱、酸调 pH 值法溶解,形成的人工抗原形态差异较大。前一处理形成的人工抗原呈絮状物沉淀状态,后一处理形成的人工抗原呈溶解状态。用这二种形态不同的人工抗原免疫动物,最终免疫效果也差异较大,以强碱、酸调 pH 值助溶半抗原 2,4-DB 或 2,4-D 合成的人工免疫抗原免疫动物效果,均好于以有机溶剂 DMF 助溶上述半抗原合成的人工抗原的免疫效果,具体表现在制备的抗血清效价高,特异性强。这可能是由于前种处理形成的

表 1 2,4-D 多克隆抗体对几种 2,4-D 结构类似物的交叉反应性			
Table 1 The Cross-reactivity of the polyclonal antibody against 2,4-D analogous compounds			
化合物名称 (Compounds)	结构简式 (Structure skeleton symbol)	抑制中浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ The midmost inhibitory con-centration(I_{50})	交叉反应率 cross-reactivity(CR, %)
2,4-滴(2,4-D)		0.179 8	100
2,4-滴丁酸(2,4-DB)		0.089 48	200.9
2,4-滴丁酯(2,4-D butyl ester)		0.301 0	59.7
2,4-滴异丙酯(2,4-D isopropyl ester)		0.276 62	65.0
2,4-二氯苯酚(2,4-dichlorophenol)		0.332 5	54.1
2 甲 4 氯(MCPA)		2.166	8.3
2,4,5-涕(2,4,5-T)		2.02	8.9
2,4,5-涕丙酸(2,4,5-TP)		3.46	5.2
2,4-滴丙酸(Dichlorprop)		463.7	0.039

人工抗原,对载体蛋白的影响较小,没有发生变性,因而呈溶解状,对免疫效果未产生消极影响;后种处理形成的人工抗原中载体蛋白影响较大,可能发生变性或凝聚,免疫效果相应降低。

在研究中还发现,选用不同的包被原与制备多克隆抗体反应时亲合力明显不同,2,4-DB-OVA 的明显高于 2,4-D-OVA,但从检测 2,4-D 灵敏度和特异性上看,用 2,4-D-OVA 做包被原,明显好于用 2,4-DB-OVA 做包被原。可见,不是多克隆抗体的亲合力越强,检测灵敏度越高,关键是要看农药在竞争反应中的能力是否能凸显出来^[18]。据此可认为,异源分析可显著提高检测灵敏度,可能是该种组合方式,可适当削弱制备的多克隆抗体与包被原之间的亲合力,相对增加目标检测农药分子(2,4-D)的竞争反应能力。

在农药的合成与开发过程中,往往通过修饰一种母体结构上的特定基团(官能团)来衍生出多种具生物活性的农药,如本文中除草剂 2,4-D 及其结构类似物 2,4-D butyl ester、2,4-D isopropyl ester 等。这些结构类似的化合物在免疫分析过程中不可避免地产生交叉反应,这会对农药结构分析带来不便。但这一特性对农药的现场分析十分有利,因为多数情况下检测人员只需确定某种类型农药的残留,因此,在农产品初检时可较多采用免疫分析技术^[19]。

参考文献:

- [1] Purcell V, Neault J F, Malonga H, et al. Interactions of atrazine and 2,4-D with human serum albumin studied by gel and capillary electrophoresis, and FTIR spectroscopy [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1548: 129–138.
- [2] Cox C. Herbicide fact sheet 2, 4-D; toxicology, part 1 [J]. *Jour Pest Reform*, 1999, 19(1): 14–19.
- [3] Cox C. Herbicide fact sheet 2, 4-D; toxicology, part 2 [J]. *Jour Pest Reform*, 1999, 19(2): 14–19.
- [4] Guidelines for drinking water quality. Addendum to Vol. 1. Recommendations[S]. WHO, 2003. 20–21.
- [5] 生活饮用水卫生规范[S]. 中华人民共和国卫生部, 2001. Sanitation Standard of Life Drinking water[S]. the Medical department of the People's Republic of China, 2001.
- [6] 杨永珍, 刘光学, 何艺兵. 农产品农药残留限量标准[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001. 1–7. YANG Yong-zhen, LIU Guang-xue, HE Yi-bing. Standards of the pesticide residue tolerance of the agricultural products [M]. Beijing: Agricultural Publishing House of China, 2001. 1–7.
- [7] Anne Zek, Anja Eikenberg, Michael G Weller, et al. Highly sensitive

- immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine] microcystins[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 441: 1–13.
- [8] Kramer K. Synthesis of a group-selective antibody library against haptens[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2002, 266(1–2): 209–220.
 - [9] 朱国念, 杨挺, 吴银良. 抗克百威多克隆抗体的研制 [J]. 中国农业科学, 2002, 35(8): 1025–1029. ZHU Guo-nian, YANG Ting, WU Yin-liang. Development of anti-carbofuran antibodies[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(8): 1025–1029.
 - [10] 许艇, 邵晓龙, 李季. 除草剂 2, 4-D 特异性多克隆抗体的制备及鉴定[J]. 生物技术, 2003, 13(4): 19–21. XU Ting, SHAO Xiao-long, LI Ji. Production and Identification of polyclonal antibody for herbicide[J]. *Biotechnology*, 2003, 13(4): 19–21.
 - [11] Haládeck J, Hepel M, Skládal P. Investigation of highly sensitive piezoelectric immunosensors for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid[J]. *Biosen & Bioelectro*, 2001, 16: 253–260.
 - [12] Franek M, Kolar V, Granatova M. Monoclonal ELISA for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid; Characterization of antibodies and assay optimization[J]. *J Agric Food Chem*, 1994, 42: 1369–1374.
 - [13] Rinder D F, Fleeker J R. A radioimmunoassay to screen for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid in surface water[J]. *Bull Environm Contam Toxicol*, 1981, 26: 375–380.
 - [14] Knopp D, Nuhn P. Radioimmunoassay for 2, 4-dichlorophen-2, 4-dichlorophen-oxyacetic acid[J]. *Arch Toxicol*, 1985, 58: 27–32.
 - [15] 余若楨, 施汉昌, 何苗, 等. 2, 4-二氯苯氧乙酸完全抗原和抗体的制备[J]. 中国环境科学, 2005, 25(3): 288–292. YU Ruo-zhen, SHI Han-chang, HE Miao, et al. Preparation of complete antigen and antibody for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid [J]. *China Environmental Science*, 2005, 25(3): 288–292.
 - [16] Stars J V, Wright R W, Swingle D M. Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions[J]. *Anal Biochem*, 1986, 156: 220–222.
 - [17] 吕会田, 乐加昌, 陈存社. 克伦特罗小分子半抗原偶联率的测定方法研究[J]. 饲料工业, 2005, 26(3): 57–59. LU Hui-tian, LUO Jiao-cheng, CHEN Cun-she. Study on the determine methods of the coupling ratio of haptens clenbuterol hydrochloride (CL)[J]. *China fodder*, 2005, 26(3): 57–59.
 - [18] 施海燕, 吴慧明, 程敬丽, 等. 2 甲 4 氯人工抗原的合成与鉴定[J]. 农药学报, 2004, 6(2): 20–24. SHI Hai-yan, WU Hui-ming, CHENG Jing-li, et al. Synthesis and identification of artificial antigen for MCPA[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2004, 6(2): 20–24.
 - [19] 杨依军, 王勇, 杨秀英, 等. 免疫分析法在农药残留分析中的应用[J]. 华北农学报, 2001, 16(4): 119–124. YANG Yi-jun, WANG Yong, YANG Xiu-rong, et al. Approach to immunoassay as analytical technique of pesticide residues[J]. *Acta Agricultural Boreali-Sinica*, 2001, 16(4): 119–124.