

• 研究简报 •

乙草胺人工抗原的合成及其单克隆抗体的制备

梅平^{*1}, 惠小敏^{1,2}, 王雄²

(1. 长江大学 化学与环境工程学院, 湖北 荆州 434023; 2. 北京中检维康技术有限公司, 北京 100044)

摘要: 通过乙草胺与 3-巯基丙酸在碱性条件下反应合成了半抗原——乙草胺-巯基丙酸 (AMPA)。采用活性酯法将半抗原 AMPA 分别与牛血清白蛋白 (BSA) 和卵清蛋白 (OVA) 偶联制备了人工抗原。通过紫外光谱测定了 AMPA 与 BSA 及 OVA 间的分子结合比分别为 41 和 26。用 AMPA-BSA 免疫小鼠, 制备得到的单克隆抗体的效价为 $1:16 \times 10^4$ 。以 AMPA-OVA 作包被抗原, 用乙草胺单克隆抗体建立了 ELISA 检测方法, IC_{50} 值为 $0.55 \mu\text{g/L}$, 方法的检测范围为 $0.04 \sim 5 \mu\text{g/L}$, 检测限为 $0.04 \mu\text{g/L}$ 。

关键词: 乙草胺; 半抗原; 人工抗原; 单克隆抗体

中图分类号: R392.11

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2008)01-0109-04

Synthesis of Artificial Antigen and Preparation of Monoclonal Antibody for Acetochlor

MEI Ping^{*1}, HU Xiao-Min^{1,2}, WANG Xiong²

(1. College of Chemistry and Environmental Engineering of Yangtze University, Jingzhou 434023, China;

2. Ciber Technology Group Inc. of Beijing, Beijing 100044, China)

Abstract The hapten of acetochlor-AMPA (AMPA) was synthesized by the reaction of acetochlor with 3-mercaptopropionic acid in alkaline solution. The artificial antigens (AMPA-BSA/OVA) were synthesized by coupling of molecules between hapten and BSA, OVA respectively with active ester method. The molar ratio was 41, 26 for AMPA-BSA and AMPA-OVA respectively detected by UV spectro-photometer. Mice were immunized by injection of antigen AMPA-BSA. The monoclonal antibody was produced with titer of $1:16 \times 10^4$. The ELISA method based upon AMPA-OVA and monoclonal antibody was established. This ELISA method showed its IC_{50} value was $0.55 \mu\text{g/L}$, the response range for acetochlor was $0.04 \sim 5 \mu\text{g/L}$, and limit of detection was $0.04 \mu\text{g/L}$.

Key words acetochlor; hapten; artificial antigen; monoclonal antibody

乙草胺 (I) 是一种优秀的选择性芽前酰胺类除草剂, 但由于乙草胺及其代谢产物醌亚胺具有致癌作用, 已被美国环境保护局定为 B-2 类致癌物^[1]。2005 年日本检疫站在对中国产松菇进行检查过程中, 连续两次发现松菇中的乙草胺残留超过其实施的“一律标准” 0.01 mg/kg , 严重影响了我国的进出口贸易。因此有必要建立简便易行的

乙草胺残留的检测方法。目前, 国内外乙草胺的残留检测主要依靠理化检验方法, 即气相色谱和 GC-MS 法, 但其样品前处理复杂、繁琐费时。免疫学分析方法由于具有灵敏、快速、特异、简便等优点倍受欢迎。国外对乙草胺残留的免疫学检测研究是先合成乙草胺半抗原和免疫原^[2] (见图 1、2), 再用免疫原免疫动物获得针对乙草胺的抗体

收稿日期: 2007-10-22; 修回日期: 2008-01-25.

作者简介: * 梅平 (1961-), 男, 通讯作者, 硕士, 教授, 现主要从事农药化学方面的教学与研究工作. 联系电话: 0716-8060472 E-mail: meipinghl@126.com

基金项目: 湖北省重点科技攻关项目 (2005AA101G33) 资助.

而建立免疫检测方法,但国外的研究报道只限于乙草胺多克隆抗体的制备^[3,4],有关乙草胺单克隆抗体的制备及其残留免疫学分析方法尚未见报道。作者参照文献[2]的方法合成了乙草胺人工

抗原,制备了乙草胺单克隆抗体,旨在为乙草胺残留检测的酶联免疫分析方法(ELISA)和免疫亲和色谱(IAC)方法的建立奠定基础。

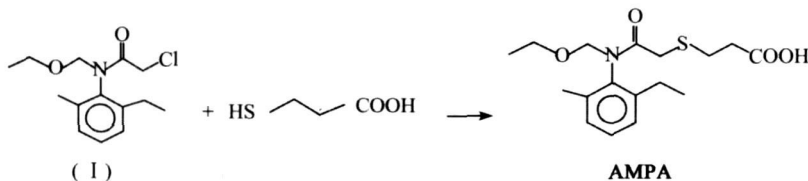


图1 乙草胺半抗原(AMPA)的合成路线

Fig. 1 The synthetic scheme of the hapten of acetochlor

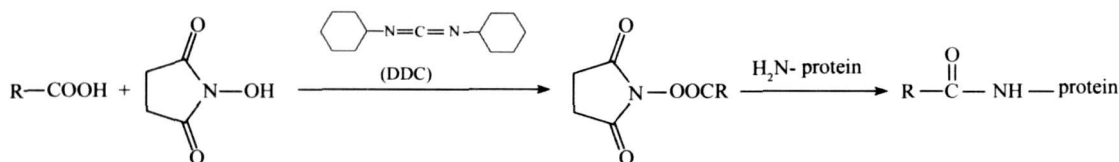


图2 乙草胺免疫抗原/包被抗原的合成路线(R-COOH为AMPA)

Fig. 2 The synthetic scheme of the antigen of acetochlor

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

1.1.1 实验药品 乙草胺(acetochlor)(94.5%)、甲草胺(alachlor)(93%)、异丙甲草胺(metolachlor)(96%)、丁草胺(butachlor)(92%)标准品,均为山东侨昌化学有限公司产品;3-巯基丙酸,纯度为99%(Acros Organics公司产品);N,N-二环己基碳二亚胺(DCC)(国药集团化学试剂有限公司);N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)(Marecambe England公司生产);牛血清白蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)(Sigma公司);羊抗鼠酶标二抗(北京博奥森生物技术有限公司);硅胶G₂₅₄(粒径为20~40 μm,青岛海洋化工有限公司);弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂(Santa Cruz生物技术有限公司产品);羧甲基纤维素(CMC)等均为分析纯。

1.1.2 试剂和材料 pH值7.2(含0.15 mol/L的NaCl)的磷酸盐缓冲溶液(PBS);包被缓冲液(pH 9.6, 0.05 mol/L的碳酸盐缓冲液);薄层色谱板制备:称取20.0 g薄层层析硅胶,加入44 mL 0.1%的CMC溶液,搅拌研磨成糊状后用玻璃棒将其分流至19块小玻璃板(2.5 cm × 7.5 cm)或者1块大玻璃板(20 cm × 20 cm),均匀展开,晾干后于120℃下烘干活化40 min。7周龄BALB/c小鼠,购于中国科学院遗传研究所。

1.1.3 主要仪器 UV-1100紫外分光光度计;

YCN-11三用紫外分析仪;酶标测定仪(上海雷勃仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 半抗原AMPA、人工抗原AMPA-BSA和AMPA-OVA的合成及鉴定 参照文献[2]的方法。将0.26 g(1 mmol)乙草胺、0.11 g(1 mmol)3-巯基丙酸及0.11 g(2 mmol)氢氧化钾混合,于乙醇中回流,经抽率、脱溶、调节pH值及萃取、旋蒸等处理得0.5 mL淡黄色粘稠产物。采用薄层色谱法进行分离提纯,以乙草胺标准品为对照,以二氯甲烷-乙酸乙酯(50:1,体积比)为展开剂,采用三用紫外分析仪测得目标物和乙草胺标准品的R_f值分别为0.607、0.785。采用薄层色谱大板同法分离0.5 mL目标物,取下与乙草胺标准品不在同一位置的色谱带,经乙酸乙酯溶解后抽滤,脱溶得0.184 g黄色粘稠状产物(以乙草胺计,产率为54.6%),经薄层色谱法^[5]测定产物半抗原的纯度为98%。采用红外光谱KBr压片法对其结构进行鉴定。

人工抗原AMPA-BSA及AMPA-OVA的合成参照文献[2]方法进行。采用紫外光谱法进行鉴定。即用PBS分别配制0.04 g/L的BSA、OVA、半抗原和免疫原溶液,用紫外分光光度计测定其在200~400 nm范围的紫外吸收曲线。

1.2.2 单克隆抗体的制备及鉴定 用无菌PBS配制一定浓度的AMPA-BSA溶液,加等体积的弗

氏完全佐剂, 乳化完全后免疫 7 周龄 BALB/c 小鼠 5 只, 背部皮内多点注射, 每只免疫剂量为 $90 \mu\text{g}$ (以 BSA 计)。首次免疫后第 4 周进行加强免疫, 共 5 次, 每次间隔 3 周, 加强免疫时使用弗氏不完全佐剂混合。第 4 次免疫 10 d 后分别从眼球采血, 于 3000 r/min 下离心, 纯化血清。对血清进行效价测定。选择血清效价较好的小鼠, 分离脾细胞后进行细胞融合, 通过有限稀释法筛选高分泌特异性细胞株扩大培养或冻存。选用 BALB/c 小鼠或其亲代小鼠, 用降植烷或液体石蜡进行小鼠腹腔注射, 一周后将筛选出的阳性杂交瘤细胞接种到小鼠腹腔, 接种一周后即有明显的腹水产生, 收集腹水, 饱和硫酸铵法纯化腹水。用间接 ELISA 法测定腹水中单克隆抗体的效价。选择与乙草胺结构相似且使用量较大的农药丁草胺、甲草胺、异丙甲草胺, 用间接 ELISA 法测定各竞争物的 IC_{50} 值, 按照下列公式计算其交叉反应率 (CR%)。

$$\text{CR}(\%) = \frac{\text{乙草胺的 } \text{IC}_{50} \text{ 值}}{\text{交叉反应物的 } \text{IC}_{50} \text{ 值}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 半抗原及人工抗原的鉴定结果

2.1.1 半抗原的红外图谱分析 经红外图谱知, 1021 cm^{-1} 处出现苯环的特征峰, 1169 cm^{-1} 处出现 C-O-C 反对称伸缩振动峰, 1311 cm^{-1} (C-O 的伸缩振动)、 928 cm^{-1} (C-OH 的面外弯曲振动)、 1589 cm^{-1} 处 (COO 非对称的振动)、 1416 cm^{-1} (COO 对称的振动)、 569 cm^{-1} (OCO 的面外摇摆振动) 和 1443 cm^{-1} 处 (C-OH 的面内弯曲振动) 出现的峰以及 $3300 \sim 2500 \text{ cm}^{-1}$ 出现的弥散峰说明羧基的存在, 1375 cm^{-1} 和 1464 cm^{-1} 处同时出现的峰说明有甲基的存在 (甲基的对称变角与非对称变角), 1713 cm^{-1} 处是 C=O 的特征峰, 1262 cm^{-1} 处是 CN 的特征峰。

2.1.2 人工抗原的 UV 鉴定结果 取分析物紫外图谱 (图 3~4) 中 280 nm 和 260 nm 处的吸光度值, 计算^[6] 得出 AMPA 与 BSA 及 OVA 分子间的结合比分别为 41 和 26。

2.2 抗体的鉴定结果

用包被缓冲液将浓度为 7.84 mg/mL 的乙草胺包被抗原 AMPA-OVA 稀释为 5 个倍数的浓度 ($a = 5 \times 10^3$, $b = 1 \times 10^4$, $c = 15 \times 10^3$, $d = 2 \times 10^4$, $e = 3 \times 10^4$), 横向包被酶标板, 用 PBS 将纯化的 5 种乙草胺血清均稀释 $A = 5 \times 10^4$, $B = 7 \times 10^4$, C

$= 9 \times 10^4$, $D = 11 \times 10^4$, $E = 13 \times 10^4$, $F = 15 \times 10^4$, $G = 17 \times 10^4$, $H = 20 \times 10^4$ 倍, 按照正交法得到包被原和血清各工作浓度时 OD_{490} 光度值。当 OD_{490} 值为 1.0 左右时血清的稀释倍数即为效价值。结果表明, 当 AMPA-OVA 稀释 2×10^4 倍 (浓度为 $0.4 \mu\text{g/mL}$) 时, 5 种抗血清的效价分别为 9×10^4 , 9×10^4 , 13×10^4 , 17×10^4 , 13×10^4 。

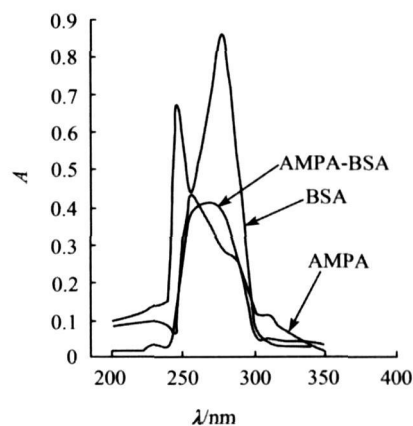


图 3 BSA、AMPA 和 AMPA-BSA 紫外图谱

Fig. 3 The UV spectra of BSA, AMPA and AMPA-BSA

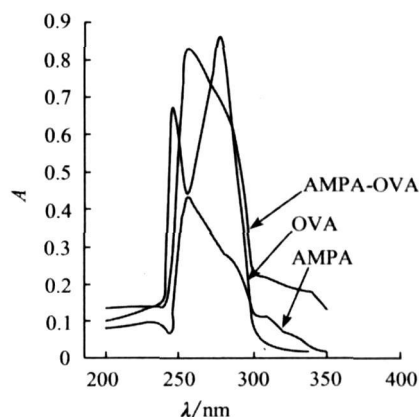


图 4 OVA、AMPA 和 AMPA-OVA 紫外图谱

Fig. 4 The UV spectra of OVA, AMPA and AMPA-OVA

用包被缓冲液将乙草胺包被抗原稀释至 $0.4 \mu\text{g/mL}$, 包被酶标板。根据效价值, 将纯化的 5 种乙草胺血清按照效价值的一半进行稀释, 用 10% 甲醇水溶液配制乙草胺标准品系列溶液。用间接 ELISA 法 (稀释好的血清溶液与标准品系列溶液的体积均为 $50 \mu\text{L}$), 进行 5 种乙草胺血清的抑制试验。结果表明, 4 号鼠多抗血清抑制最好, IC_{50} 值最小, 为 $56.1 \mu\text{g/L}$, 检测限^[7] 为 $5 \mu\text{g/L}$, 检测范围在 $5 \sim 100 \mu\text{g/L}$ 之间。

采用同样方法得到由 4 号鼠制备的腹水的效价为 16×10^4 。将腹水稀释 8 万倍且在乙草胺包被抗原稀释 2 万倍 (浓度为 $0.4 \mu\text{g/mL}$) 时得到抑制曲线 (见图 5), IC_{50} 值为 $0.55 \mu\text{g/L}$, 检测限为 $0.04 \mu\text{g/L}$, 检测范围为 $0.04 \sim 5 \mu\text{g/L}$ 。

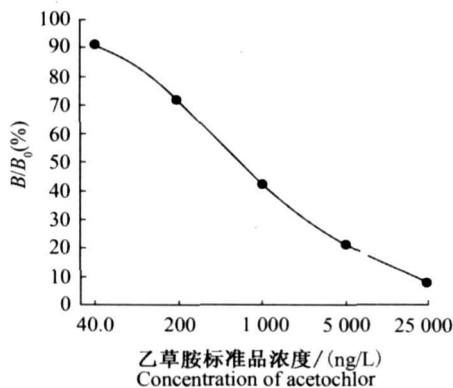


图 5 乙草胺单克隆抗体的抑制曲线 (纵坐标吸光度 B/B_0 , 其中 B 为一定浓度乙草胺与抗体反应后的 OD_{490} 值, B_0 为乙草胺浓度为零时 OD_{490} 值)

Fig. 5 The inhibition curve of monoclonal antibody of acetochlor (B/B_0 is absorbency ratio, B is the OD_{490} after the reaction between acetochlor at definite dose and antibody, B_0 is the OD_{490} at zero acetochlor dose)

对乙草胺多克隆抗体和单克隆抗体与甲草胺、异丙甲草胺、丁草胺分别进行交叉反应实验, 结果见表 1。可知, 其交叉反应率均很低, 说明抗体的特异性很强, 且单克隆抗体的特异性比多克隆抗体更强。

表 1 乙草胺多抗及单抗与其同类物的交叉反应率
Table 1 The ratio of cross reaction between the polyclonal antibody and monoclonal antibody of acetochlor and other structural related compounds

乙草胺抗体 Antibodies of acetochlor	交叉反应率, CR (%)		
	甲草胺 Alachlor	异丙甲草胺 Metolachlor	丁草胺 Butachlor
多抗 Polyclonal antibody	0.4	2.1	0.6
单抗 Monoclonal antibody	0.01	0.05	0.03

3 讨论

经过对半抗原的红外图谱、抗原的紫外图谱以及获得的抗体的 ELISA 进行分析, 表明乙草胺人工抗原合成成功, 单克隆抗体制备成功。

获得特异性强的抗体是建立 ELISA、IAC 分析方法的关键。本研究制备的乙草胺多克隆抗体与 Hegedus 等^[3] 制备的多克隆抗体 (IC_{50} 值为 $2.15 \pm 0.77 \mu\text{g/L}$, 交叉反应率在 $1.4\% \sim 8.7\%$ 之间, 检测限为 $0.2 \mu\text{g/L}$) 相比, 效果较差, 问题可能是由于免疫抗原中分子结合比不好, 以及受离心沉淀法纯化血清等因素的影响, 使得到的多克隆抗体纯度不高, 从而影响了其特异性。因此合成不同结合比的乙草胺免疫原, 用饱和硫酸铵法或 FPLC 系统结合自装层析柱纯化血清^[8], 优化多克隆抗体建立的乙草胺免疫检测方法是十分必要的。

得到的乙草胺单克隆抗体的效价为 16×10^4 , IC_{50} 值为 $0.55 \mu\text{g/L}$, 与结构类似农药的交叉反应率在 $0.01\% \sim 0.05\%$ 之间, 所建立方法的检测限为 $0.04 \mu\text{g/L}$, 用本研究合成的人工抗原制备乙草胺单克隆抗体建立的 ELISA 免疫分析方法检测限较低。

参考文献:

[1] U S Environmental Protection Agency, Questions and Answers Conditional Registration of Acetochlor [R]. U. S. EPA, Washington D C, 1994 18.

[2] YAKOVLEVA J N, LOBANOVA A, PANCKENKO O. A, et al Production of Antibodies and Development of Specific Polarization Fluoroimmunoassay for Acetochlor [J]. Environ Anal Chem, 2002, 82(11-12): 851-863.

[3] HEGEDUS G, KR KUNOVA V, BELAJI et al The Enzyme Linked Immunoassay for the Detection of Acetochlor [J]. Environ Anal Chem, 2002, 82(11-12): 879-891

[4] FENG P C, HORTON S, SHARP C R, et al A General Method for Developing Immunoassays to Chloroacetanilide Herbicides [J]. Agric Food Chem, 1992, 40 211-214

[5] LIW ei-jia(李卫家), WANG Shi-hua(王世华). 薄层色谱法测定有机锡化合物和三苯基膦的纯度 [J]. Chemica World (化学世界), 1992, 5(10): 225-226

[6] YAKOVLEVA J ZHERDEV A V, POPOVA V A, et al Production of Antibodies and Development of Enzyme-linked Immunosorbent Assays for the Herbicide Butachlor [J]. Anal Chem Acta, 2003 491(1): 1-13.

[7] LEI Hong-tao(雷红涛), FENG Wei-wen(冯伟雯), SHEN Yu-dong(沈玉栋), et al 除草剂丁草胺的直接竞争 ELISA 检测方法研究 [J]. J Agro-environ Sci(农业环境科学学报), 2006 25(4): 1018-1023.

[8] WEI Yan-yu(韦颜余), XIA Xue-shan(夏雪山), BIKun-bing(费昆龙), et al 利用 FPLC 系统结合自装层析柱纯化兔血清 IgG [J]. Biotechnology(生物技术), 2004, 14(6): 46-47

(Ed JIN SH)