

# 除草剂2,4-D完全抗原的合成与鉴定

于基成<sup>1,2</sup>, 刘秋, 赵娜, 曹远银\*, 范圣第

(1. 沈阳农业大学植物保护学院, 辽宁沈阳110161; 2. 大连民族学院生命科学学院, 辽宁大连116600)

**摘要** 通过活化酯法和混合酸酐法, 用牛血清蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)合成2,4-D免疫抗原和包被抗原, 再分别采用紫外分光光度法和酶联免疫吸附法(ELISA)进行鉴定。结果是: 2种方法合成的完全抗原中2,4-D和蛋白质的偶联比分别为24:1和17:1, 抗血清效价为 $1.28 \times 10^4 \sim 2.56 \times 10^4$ 。

**关键词** 2,4-D; 完全抗原; 合成; 鉴定; ELISA

中图分类号 S842.4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)13-03791-02

## Synthesis and Identification of the Immune Antigens for Herbicide 2,4-D

YU Ji-cheng et al (College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract** In the lab experiment, through using active ester method and mixed anhydride method, the immunity antigens and coating antigens of herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) was synthesized by bovine serum albumin (BSA) or ovalbumin (OVA) and identified by ultraviolet spectrophotometry and ELISA. The results showed that the ratio of 2,4-D BSA was 24:1, and that of 2,4-D OVA was 17:1, respectively. The anti-2,4-D polyclonal antibodies were obtained by using the artificial immune antigen (2,4-D BSA) to immune in the New Zealand rabbits. The titer of anti-serum was from  $1.28 \times 10^4$  to  $2.56 \times 10^4$ .

**Key words** 2,4-D; Immune antigen; Synthesis; Identification; ELISA

2,4-D是苯氧羧酸类除草剂, 广泛应用于小麦、大麦、玉米、草坪、牧草场等防除阔叶草。据统计, 大约有1500种农药产品中含有2,4-D活性成分。人长期暴露在高浓度的2,4-D中会影响其中枢神经系统, 并具有潜在的致癌性, 对免疫和生育系统都有不良影响。鉴于2,4-D对人类健康和生态环境的危害, 世界卫生组织(WHO)和美国环境保护署(EPA)都对饮用水中2,4-D的最大检出浓度作了严格规定。2001年我国新颁布的《饮用水水质卫生规范》的非常规检测项目中, 将2,4-D的限值规定为0.03 ng/L。目前, 2,4-D残留检测方法主要有气相色谱(GC)、气质联用(GC/MS)和高效液相色谱(HPLC)等<sup>[1-2]</sup>。但这些方法具有样品前处理时间长、仪器设备昂贵和需要专业的技术人员等缺点, 而免疫检测技术具有简单、快捷、检测容量大等优点, 是近几年快速和优先发展的检测技术。国外已有2,4-D的免疫检测方法的相关报道<sup>[3-5]</sup>。免疫检测技术的基础是抗体的制备。由于大多数农药都是小分子化合物, 只具有反应原性, 而无免疫原性, 因此农药完全抗原的合成则成为建立农药免疫检测方法的关键。为此, 笔者初步研究了2,4-D的人工抗原的合成方法。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 牛血清蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、弗氏完全佐剂(CFA)和弗氏不完全佐剂(IFA)、辣根过氧化酶标记的羊抗兔抗体(IgG), 均购自于大连博瑞得生物有限公司。碳化二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酸亚胺(NHS)、氯丁酸异丁酯、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、三正丁胺, 均购自大连开米隆生物科技有限公司。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 2,4-D完全抗原的合成。

**1.2.1.1 活化酯法(合成免疫抗原)**。用NHS溶解适量2,4-D, 并逐滴加到溶有适量BSA的0.01 ml/L pH 7.4的磷酸缓

冲液中, 同时加入约10 mg EDC, 室温下搅拌24 h, 反应液对蒸馏水透析, 期间换水5~6次, 真空冷冻干燥。

**1.2.1.2 混合酸酐法(合成包被抗原)**。用适量的DMF溶解2,4-D, 然后依次加入少量的三正丁胺、氯甲酸异丁酯, 室温搅拌反应1 h, 离心, 上清液逐滴加入到溶解有OVA的0.05 ml/L pH 9.6的碳酸盐缓冲液中, 室温搅拌, 过夜, 上清液透析, 冷冻干燥, 4℃保存。

### 1.2.2 蛋白质和2,4-D偶联比的测定<sup>[6]</sup>。

**1.2.2.1 人工抗原中蛋白质的测定**。采用Bradford法测定人工抗原中蛋白质含量, 以0.01 mol/L pH 7.4的磷酸缓冲液配制BSA浓度分别为2、4、6、8、10、12 g/ml, 配制人工抗原浓度为1 ng/ml, 在波长为595 nm下测定其吸光值, 绘制GA曲线, 并计算人工抗原中蛋白质含量。

**1.2.2.2 人工抗原中2,4-D含量的估算**。配制2,4-D、BSA、OVA、2,4-D BSA、2,4-D OVA配制浓度都为1 ng/ml, 在波长为229 nm下分别测定其吸光值, 并分别计算该波长下2,4-D BSA、2,4-D OVA中2,4-D和BSA、OVA的浓度。

### 1.2.3 完全抗原的鉴定。

**1.2.3.1 紫外光谱鉴定**。适当浓度的2,4-D和上述2种方法合成的2,4-D完全抗原, 在200~400 nm进行光谱扫描。

**1.2.3.2 抗体制备**。以偶联物合物2,4-D BSA为免疫抗原免疫3只新西兰雌性大白兔, 先进行基础免疫, 免疫剂量为0.5 ng/kg体重。免疫抗原用生理盐水稀释, 加等体积弗氏完全佐剂充分乳化, 注射时采用背部皮下注射的方法, 4周后加强免疫, 免疫剂量为基础免疫的20%。改用弗氏不完全佐剂, 每2周加强免疫1次。从第3周加强免疫开始, 免疫后8~10 d耳静脉取血, 采用间接竞争ELISA法测定抗血清的效价。效价合格后, 心脏采取全血, 分离抗血清, 并采用辛酸-硫酸铵2步沉淀法<sup>[7]</sup>纯化抗体, 制成冻干粉, 于-20℃保存, 备用。

**1.2.3.3 抗体效价的测定**。参照薛小平等方法<sup>[8]</sup>。

## 2 结果与分析

**2.1 合成抗原的光谱分析** 按照合成2,4-D免疫抗原和包

基金项目 科技部“十五”食品安全重大专项资助项目(2001BA804 A17-09)。

作者简介 于基成(1968-), 男, 山东龙口人, 副教授, 从事食品质量与安全方面的研究。\* 通讯作者。

收稿日期 2007-02-01

被抗原时反应物、产物的比例,分别取反应物和产物以 0.01 ml/L PBS 溶液溶解,并且进行紫外(200~340 nm)扫描。由图 1、2 可知,偶联物 2,4-D BSA 和 2,4-D OVA 分别在 214.9、210.1 nm 和 279.7、268.2 nm 处出现吸收峰。与 2,4-D、BSA 和 OVA 的吸收峰相比,发生了明显的变化,偶联物分别具有了 2,4-D、BSA、OVA 的特征,初步表明人工抗原 2,4-D BSA 和 2,4-D OVA 完全抗原合成的成功<sup>[9]</sup>。

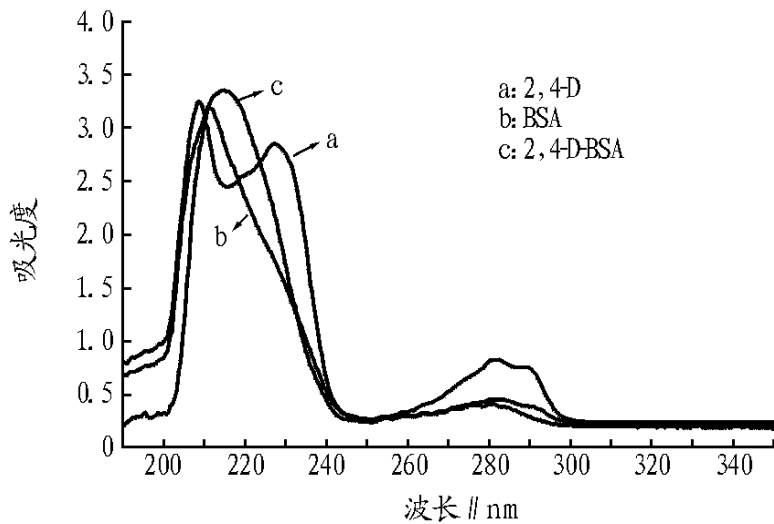


图1 2,4-D、2,4-D BSA 和 BSA 的紫外光谱

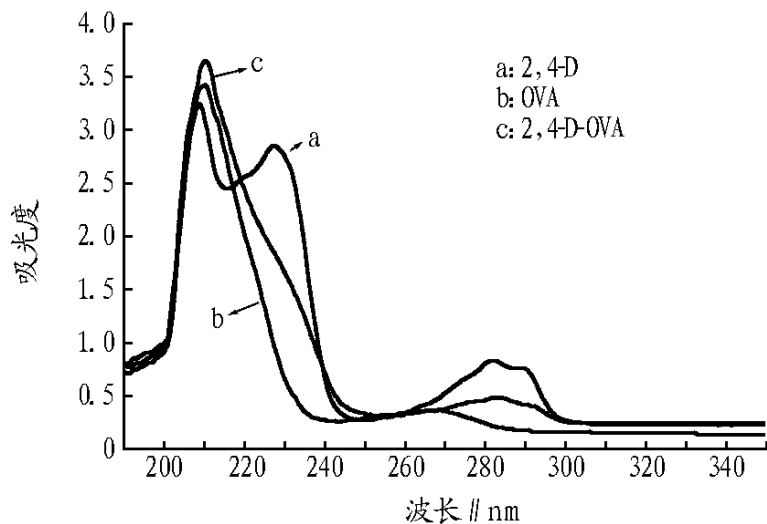


图2 2,4-D、2,4-D OVA 和 OVA 的紫外光谱

在农药残留的免疫化学分析中,人工抗原的合成是制备抗体和建立免疫分析方法最关键的步骤。半抗原的设计又是合成人工抗原的前提。半抗原的设计应考虑 2 个方面的因素: 能否刺激机体产生免疫应答; 产生的抗体是否具有预期的活性。

若半抗原结构中含有芳香结构,则可提高成功率。而 2,4-D 是一种含有芳香环结构的化合物,其 1 位上含有 -OCH<sub>2</sub>COOH,易与蛋白的氨基合成肽键。

**2.2 偶联比** 根据测得的吸光值、摩尔吸收系数,计算得到活化酯法合成的完全抗原中 BSA 与 2,4-D 比例为 24:1,混合酸酐法合成的完全抗原中 OVA 与 2,4-D 比例为 17:1,基本符

合农药小分子与蛋白质偶联比的范围要求<sup>[6]</sup>。

过去研究认为,联接到蛋白质分子上的半抗原数目要尽可能的多。但试验证明,过多的半抗原并不能得到预期的结果。这是因为载体上覆盖的半抗原分子过多,则可能不利于载体与淋巴细胞表面结合,从而不能引起免疫反应。有研究认为,当偶联比为(34~5):1时,免疫原性较强<sup>[10]</sup>;也有研究认为,最佳的抗原偶联率为(10~20):1<sup>[6]</sup>。该研究发现,从产生的抗血清效价来看,当偶联比为(15~25):1时抗原的特异性较高。因此,可以认为产生高效价的抗体是偶联抗原成功的重要标志。

**2.3 抗体效价** 根据方阵滴定原理,采用间接竞争 ELISA 法测定抗 2,4-D 抗体的效价,以酶促显色反应产物的 A 值约为 1.0 时抗血清的稀释倍数为中点效价。当包被抗原 2,4-D OVA 的浓度为 4.0 μg/ml 时,抗血清的效价分别为 2.56 × 10<sup>4</sup>、1.28 × 10<sup>4</sup>、1.28 × 10<sup>4</sup>。间接竞争 ELISA 方法中抗原与抗体的最适工作浓度为包被抗原 2,4-D OVA 1.0 μg/ml,抗体 0.1 μg/ml。

### 3 结论

对分别利用活化酯法和混合酸酐法合成的除草剂 2,4-D 免疫抗原(2,4-D BSA)和包被抗原(2,4-D OVA)进行紫外光谱分析,并且通过间接竞争 ELISA 法检测利用 2,4-D 免疫抗原免疫新西兰雌性大白兔获得的抗血清效价,可确定采用 2 种方法成功合成了 2,4-D 的完全抗原。这为进一步建立 2,4-D 的快速免疫检测方法奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 李金昶,王璐,韩明友,等.固相萃取富集高效液相色谱法测定苯氧乙酸和 2,4-二氯苯氧乙酸[J].分析化学,2001,29(5):580-582.
- [2] 左凤,夏敏,谷学新.高效液相色谱法检测两种苯氧乙酸类除草剂[J].现代科学仪器,2003(4):63-64.
- [3] CUONG NV, BACHMANN TT, SCHMID R D. Development of a dipstick immunoassay for quantitative determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in water, fruit and urine samples[J]. Fresenius J Anal Chem, 1999, 364:584-589.
- [4] FRANEK M, KOLAR V, GRANATOVA M, et al. MicroELISA for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Characterization of antibodies and assay optimization[J]. J Agric Food Chem, 1994, 42:1369-1374.
- [5] MATUSZCZYK G, KNOPP D, NEBNER R. Development of an ELISA for 2,4-D: characterization of two polyclonal antisera. Fresenius[J]. J Anal Chem, 1996, 354:41-47.
- [6] 陈建新,陈梅英,赵会杰.免疫学技术在植物科学中的应用[M].北京:中国农业大学出版社,1998:54-58.
- [7] 邓瑞春.两种不同方法纯化抗血清 IgG 的效果比较[J].免疫学杂志,1999,15(1):64-66.
- [8] 薛小平,张美顺,李荣源,等.高亲和力抗有机磷杀虫剂单克隆抗体的制备与鉴定[J].中国生物工程杂志,2003,23(6):68-71.
- [9] 孙远明,赵肃清,张春艳,等.甲胺磷人工抗原的合成与鉴定[J].免疫学杂志,2002,18(3):163-166.
- [10] 吴颂如,万寅生,周燮.植物小分子物质的免疫测定技术[J].植物生理通讯,1989,5:68-72.