

五氯硝基苯多克隆抗体的制备

邵晓龙, 李季, 王保民, 许艇

(中国农业大学资源与环境学院, 北京 100094)

摘要: 通过合成保留五氯硝基苯分子结构特性的半抗原, 将其与 BSA 偶联后免疫实验动物, 获得了特异性的五氯硝基苯多克隆抗体, 用间接酶联免疫吸附分析法检测, 最低检测限达到 $9.4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词: 五氯硝基苯; 多克隆抗体; 酶联免疫吸附分析

中图分类号: S482.26 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2004)05-0989-04

Preparation of Polyclonal Antibodies of Pentachloronitrobenzene

SHAO Xiao-long, LI-ji, WANG Bao-min, XU Ting

(China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Pentachloronitrobenzene (PCNB) is a powerful fungicide used against soilborne phytopathogenic fungi. As concerned on its carcinogenic potency, in this study, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to PCNB is presented. Polyclone antibodies for pentachloronitrobenzene were obtained by immunizing two rabbits with synthesized antigen that utilized pentachloronitrobenzene as a hapten conjugated with bovine serum albumin. With an aim of developing a highly sensitive immunoassay for PCNB, a hapten was synthesized by coupling with carrier proteins (either BSA or OVA). The hapten conjugated to BSA was used as immunizing hapten and the hapten conjugated to OVA as coating conjugate. Polyclonal antibodies was subsequently obtained by immunized rabbits and characterized for its affinity to PCNB. The antibodies were used for the optimization of an indirect ELISA for the determination of PCNB. Standard curve indicated that a good correlation between the concentrations of PCNB and the values of OD ($y = ax + b$; $r = 0.996$), with the IC_{50} value of $76.7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and a detection limit (IC_{20}) of $9.4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. The method shows low cross-reactivity (CR) for pentachlorophenol, but hexachlorobenzene can influence the antibodies and the CR with approximately 12.2%.

Keywords: pentachloronitrobenzene; polyclonal; ELISA

五氯硝基苯 (PCNB) 属取代苯类杀菌剂, 其化学结构、性质与六六六 (HCH)、滴滴涕 (DDT) 相似, 具有性质稳定、毒性大、致癌和高残留等特点^[1], 其化学结构式如图 1 所示。1930 年五氯硝基苯被用来代替水银杀虫剂的农药引入到农业生产中, 现在主要作为人参栽培过程中使用的土壤消毒剂, 也用于种子和移栽苗的杀菌处理^[2]。五氯硝基苯具有水溶性差, 易在人参根部积累的特点, 因此被列为人参产品质量检验指标之一。我国曾经因为五氯硝基苯的超标问题, 极大地影响了人参的出口。

五氯硝基苯传统的仪器检测方法包括气相色谱 (GC) 和高效液相色谱 (HPLC)。但是这些检测方法的样品前处理过程非常复杂, 容易引入干扰物质, 使检测结果受到影响。目前, 较为先进的小分子物质检测法是酶联免疫吸附分析 (ELISA), 它具有简洁快速、特异性强、灵敏度高等优点, 已被国内外研究者广泛地应用于农药残留的检测中。有关五氯硝基苯的 ELISA 技术在国内还未见报道。本试验旨在制备一种特异性的五氯硝基苯多克隆抗体, 为以后的五氯硝基

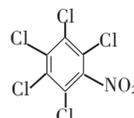


图 1 五氯硝基苯的化学结构式 (pentachloronitrobenzene)

Figure 1 Chemical structure of pentachloronitrobenzene

收稿日期: 2004-03-09

作者简介: 邵晓龙 (1979—), 男, 中国农业大学资源与环境学院生态系硕士研究生。E-mail: shaoxiaolong@sina.com

联系人: 李季, E-mail: lijicau@sohu.com

苯 ELISA 检测打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂和仪器

1.1.1 材料和试剂

五氯酚、五氯硝基苯、N-羰基琥珀酰亚胺(NHS)、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、氯甲酸异丁酯, Sigma 公司产品;牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA),北京欣经科生物技术有限公司产品;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂, GibcoBRL 公司产品;HRP 标记羊抗兔二抗 1:5 000,北京军事医学科学院产品;96孔酶标板,天津有机玻璃厂产品;其他试剂均购于北京化学试剂公司。

ELISA 所用溶液:碳酸盐缓冲液(PBS) $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH9.6; 稀释液(PBST), $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.2 磷酸缓冲液(PB), $0.14 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 0.05% 吐温-20, 0.1% 明胶; A 液: 过氧化尿 1 g, 柠檬酸 10.3 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.8 g, 吐温-80 100 μL , 蒸馏水 1 000 mL, pH5; B 液: 四甲基联苯胺(TMB) 700 mg(40 mL 二甲亚砜(DMSO)溶解), 柠檬酸 10.3 g, 蒸馏水 960 mL, pH2.4; 洗涤液: 碳酸盐缓冲液(PBS)加

0.05% 吐温-20; 终止液: $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 。以上所用化学试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

M-III 酶联免疫检测仪(华东电子管厂); LKB Biochrom4060 紫外可见分光光度计(瑞士 Pharmacia); TGL-16G 台式高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); FD-1 冷冻干燥器(北京博医康技术公司); LD4-2A 低速离心机(北京医用离心机厂); ACF-300MHZ 核磁共振仪(BRUKER)。

1.2 半抗原的合成

称取 2 g 五氯酚和 1 g K_2CO_3 溶于 30 mL 丙酮中,在氮气的保护下,加入 1.14 g 溴丙酸反应 2 h,再加入 0.5 g 溴丙酸,保持以上条件不变反应过夜。减压蒸除有机溶剂,剩余物质用浓盐酸和二氯甲烷分开,弃掉无机相,有机相用无水 Na_2SO_4 干燥,减压蒸除有机溶剂后,用硅胶柱层析净化即得到所需半抗原粗产品^[3]。通过核磁共振图谱可以看出溴丙酸通过醚化反应连接到五氯酚上,合成出目标半抗原,半抗原合成的反应设计如图 2 所示。核磁共振鉴定结果: $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 4.35(t, 2 h, $J = 7.3 \text{ Hz}$); 2.95(t, 2 h, $J = 7.3 \text{ Hz}$)。 $^{13}\text{C-NMR}(\text{DMSO})$: 171.794、151.695、

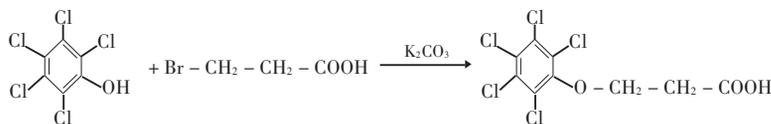


图 2 半抗原合成的反应设计

Figure 2 Reaction of synthesis of the hapten

131.041、128.213、127.950、70.348、35.006。

1.3 免疫原和包被抗原的合成

1.3.1 免疫原的合成

将 18 mg 半抗原溶解到 0.355 mL 的 N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)中,使浓度达到 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,在其中加入 7.315 mg DCC 和 4.08 mg NHS,使 DCC 和 NHS 的浓度达到 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,在室温下搅拌反应 5 h,反应液离心,取上清液。称取 10 mg BSA 溶解到 1 mL 碳酸钠缓冲液中($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH9.6)中,缓慢加入上清液,在 4°C 条件下搅拌反应 2 h。反应液装入透析袋中用 PBS($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.4)透析,每 4 h 换液一次,共换液 8 次。透析后离心,上清液冷冻干燥, 4°C 保存。

1.3.2 包被抗原的合成

反应过程同上,只需将 BSA 换成 OVA 即可。

1.4 半抗原与载体蛋白的偶联比率估算^[4]

准确称取半抗原(A)、BSA(B)、半抗原-BSA(C),用同一缓冲液配制确切浓度。分别测定这 3 种溶液在 A 和 B 最大吸收峰波长处(紫外扫描求得)的吸光值,即 AA_{am} 、 AA_{bm} 、 AB_{am} 、 AB_{bm} 、 AC_{am} 、 AC_{bm} 。同时计算 A 在 A 和 B 吸收峰波长处的克分子消光系数,即 KA_{am} 、 KA_{bm} ;以及 B 在 A 和 B 吸收峰波长处的克分子消光系数,即 KB_{am} 、 KB_{bm} 。按以下公式计算 A 和 B 物质的克分子比:

$$\text{克分子比} = \frac{(AC_{am} \times KB_{bm} - AC_{bm} \times KB_{am})}{(AC_{bm} \times KA_{am} - AC_{am} \times KA_{bm})}$$

1.5 抗体的制备

2 只体重约 2 kg 的健康新西兰大耳白兔,在动物房观察饲养一周。称 2 mg 免疫原溶于 1 mL PBS 中,与 1 mL 的弗氏完全佐剂混合,充分乳化,注射兔脚趾进行初次免疫。以后换用弗氏不完全佐剂,每隔 15 d 加强免疫一次,背部皮下多点注射。

从第 3 次免疫开始后,每次免疫后 10 d 左右,兔耳边缘静脉采血。血液在 4 ℃ 放置 4 h 后离心取血清,间接 ELISA 法测定血清效价。当抗血清达到所需的效价时,兔动脉采全血,于室温静置 2 h,再置 4 ℃ 冰箱过夜,次日以 $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,收集血清。

1.6 抗体与五氯硝基苯的亲性和

(1) 在 96 孔酶标板中每孔加入 100 μL 包被抗原,4 ℃ 过夜,弃包被液,用洗涤液洗 3 次,在吸水纸上甩干。

(2) 将 50 μL 不同浓度(0、10、50、100、200、500、1 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的五氯硝基苯标准液加入酶标板,每个浓度做 2 次重复,再加入 50 μL 五氯硝基苯抗体,放入湿盒 37 ℃ 孵育 30 min,弃液后洗板。

(3) 每孔加入 100 μL 羊抗兔酶标二抗,放入湿盒 37 ℃ 孵育 30 min,弃液后洗板。

(4) 将 A 液 B 液等体积混匀后,向酶标板各孔加入 100 μL ,避光显色 10 min 后,每孔加入 50 μL 终止液,于 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。

将含 0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 标准品孔的 OD 值减去含最大浓度标准品孔的 OD 值定为 B_0 ,其余孔用同样方法校正后的 OD 值定为 B ;以 $\lg(B/B_0)$ 值为纵坐标,相应的标准品浓度的自然对数为横坐标,绘制标准曲线。

1.7 抗体的交叉反应

按 1.6 的步骤分别对五氯硝基苯的结构类似物五氯酚和六氯苯进行交叉反应实验。建立上述 2 种物质的抑制曲线,并计算各自的 IC_{50} ,按下式计算交叉反应:

$$\text{交叉反应} = IC_{50}(\text{五氯硝基苯}) / IC_{50}(\text{类似物}) \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 半抗原与载体蛋白的偶联结果

经紫外扫描,半抗原在 290 nm 处有吸收峰 $A_{290} = 1.177$, BSA 在波长 279.9 nm 处有 $A_{279.9} = 0.740$,根据下式:克分子比 = $(AC_{am} \times KB_{bm} - AC_{bm} \times KB_{am}) / (AC_{bm} \times KA_{am} - AC_{am} \times KA_{bm})$,计算出半抗原与 BSA 的结合比约为 53:1,表明半抗原与蛋白质的偶联效果明显,但是结合比偏高,究其原因是多方面的,需要做进一步的研究。

2.2 抗血清的效价

本实验获得了高效价(稀释倍数)的抗血清。图 3 为抗血清的效价曲线,效价 $> 1.2 \times 10^6$ 倍,说明得到了稀释倍数高的免疫血清。抗体效价高,亲和常数就

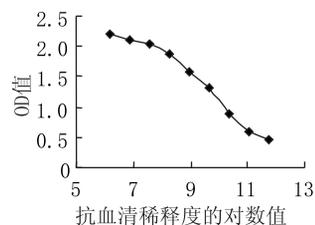


图 3 间接 ELISA 检测抗血清的效价曲线

Figure 3 Indirect ELISA method for specific curve of antibody sera

高,表明抗体的亲和力很高。

2.3 五氯硝基苯标准曲线

图 4 为优化条件下五氯硝基苯标准曲线线性化模型,计算出回归方程为 $y = -0.1429x + 1.1201$,相关系数(r)为 0.996,得到很好的标准曲线。根据回归方程计算,五氯硝基苯的最小检测极限(IC_{20})为 $9.4\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,抑制中浓度 IC_{50} 为 $76.7\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

酶联免疫测定实际样品时要通过标准曲线算出结果,标准曲线的好坏直接影响到测定结果的可靠性。图 4 建立的标准曲线线性关系良好,为后续实际样品的测定打下了基础。

2.4 抗体的特异性

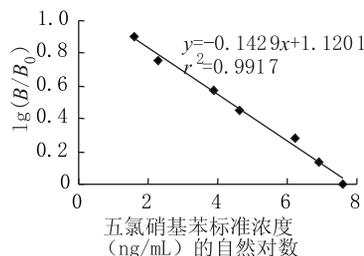


图 4 五氯硝基苯的标准曲线

Figure 4 Standard curve for pentachloronitrobenzene by ELISA

通过多克隆抗体的交叉反应实验,抗体对五氯酚的抑制中浓度 IC_{50} 为 $2\,376.7\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,交叉反应为 3.2%;抗体对六氯苯的抑制中浓度 IC_{50} 为 $627.9\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,交叉反应为 12.2%。从而可以证明本试验所获抗体对五氯硝基苯有特异性,但还有待于进一步研究抗体对其它类似物的交叉反应。

3 讨论

五氯硝基苯为小分子物质,没有免疫原性,而且它的分子特征也不能让它直接与大分子蛋白质偶联,因此要得到它的特异性抗体必须设计结构相似的半抗原与蛋白质偶联,这也是制备大多数小分子农药的设计思路。本文利用五氯酚与溴丙酸通过醚化反应合成了半抗原,该半抗原上有一个活泼的羧基能够

很好的偶联到大分子蛋白质上。通过免疫该半抗原偶联物产生了对五氯硝基苯有很强特异性的抗体。

通过交叉反应实验, 抗体对五氯酚、六氯苯的识别能力都很小。结果表明在进行半抗原合成时由于连接上了一个活性臂使分子构象发生变化。要了解具体变化的情况, 还有待于通过计算机模拟等手段进行详细的研究。

参考文献:

- [1] 蔡文贵, 孙成贺, 等. 气相色谱法测定土壤中五氯硝基苯残留量[J]. 特产研究, 2003, 2: 45 - 46.
- [2] 赵晓松, 王玉军, 等. 五氯硝基苯在土壤中的降解[J]. 农业环境保护, 1999, 18(6): 260 - 262.
- [3] Patricia Noguera, Ángel Maquieira. Development of an enzyme - linked immunosorbent assay for pentachlorophenol[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 460: 279 - 288.
- [4] 杨利国. 酶免疫测定技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998.