

## 2,4-D 完全抗原的合成及其免疫性能评价

余若祯, 何苗\*, 施汉昌, 刘举, 郭洁菡, 王娜, 钱易

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家联合重点实验室, 北京 100084)

**摘要:** 以 2,4-D 为半抗原, BSA 为载体蛋白, 通过 EDC 的偶联反应条件优化试验, 合成了多种结合比的完全抗原, 制备了小分子环境污染物的多克隆抗体。结果表明, 偶联反应优化步骤是 2,4-D、BSA 和 EDC 同时反应, 4°C 条件下反应 18h。偶联反应可以在 2,4-D 的浓度为 10.0~12.0 mg/mL 的 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲溶液中进行, 反应缓冲体系 pH 控制在 5.4~6.1 之间。EDC 的加入量低于 12 mg 时, 采用 2,4-D 和多聚赖氨酸的偶联物为包被抗原。通过 balb/c 小鼠免疫试验评价结合比分别为 6、12、18 和 25 的完全抗原的免疫性能, 结果表明结合比为 12 和 18 的完全抗原具有很好的免疫原性。其中以结合比为 18 的完全抗原免疫小鼠获得的抗血清对包被抗原载体的非特异性吸附低于阴性血清, 2,4-D 特异性血清含量高, 适于作为完全抗原免疫小鼠进一步制备单克隆抗体。

**关键词:** 2,4-二氯苯氧乙酸; 完全抗原; 抗血清; 免疫原性

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)01-0146-05

## Conjugation and Immunogenic Evaluation of Complete Immunogen for the Small Molecular Environmental Pollutants 2,4-D

YU Ruozhen, HE Miao, SHI Hanchang, LIU Ju, GUO Jiehan, WANG Na, QIAN Yi

(Environmental Simulation and Pollutants Control State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** Conjugation of complete immunogen for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) was studied. 2,4-D was cross-linked to bovine serum albumin (BSA, carrier) by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC). The conjugation reaction was found to be more effective at 4°C and incubated for 18 hour. 2,4-D was dissolved in 0.05 mol/L phosphate buffer between 10.0~12.0 mg/mL concentration, pH was adjusted to be 5.4~6.1. When the weight of added EDC was below 12 mg, the more EDC was added the higher substitution degree complete immunogen was synthesized. Complete immunogen of various substitution degree (2,4-D: protein) were applied to immunize balb/c mice. The conjugates of 2,4-D and poly-L-lysine was applied as coating antigen. It was experimentally found that complete immunogen of substitution degree 12 and 18 are more immunogenic than that of substitution degree 6 and 25. Non-specific adsorption between antiserum that was produced by complete immunogen of substitution degree 18 and coating antigen was very weak, and the antiserum contained more 2,4-D specific antibody. It could be used as the immunogen for the preparation monoclonal antibody.

**Key words:** 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid; complete immunogen; antiserum; immunogenic

2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)是一种世界范围内广泛使用的除草剂和植物生长调节剂,是20世纪全球使用最广泛和对全球农业影响最大的22种农药之一。2,4-D通过皮肤和呼吸系统进入人体,具有潜在的致癌性和致突变性;刺激人体大量分泌雌激素,干扰内分泌系统;对免疫系统和生殖系统产生不良影响;使红细胞聚集,抑制红细胞的携氧能力;损伤肝脏、肾脏、肌肉和脑组织;刺激眼睛、皮肤和粘膜<sup>[1~3]</sup>。鉴于2,4-D对人类健康和生态环境造成的危害,一些国家和国际组织在饮用水和环境标准中对2,4-D的上限浓度作了严格的规定<sup>[4]</sup>。

免疫检测技术因具有特异性强、灵敏度高、检测迅速等优势近年来在环境污染检测领域逐渐引起

关注,并对此展开了广泛和深入的研究<sup>[5~8]</sup>。免疫检测技术最为关键的环节是获得高效的特异性抗体。2,4-D这类的环境污染物本身的分子量小(相对分子量小于1000,在免疫学上称为半抗原),不能单独刺激机体产生抗体。小分子环境污染物完全抗原的制备是目前国际上环境污染物免疫检测研究的难点问题,同时也是免疫检测技术的关键环节。本文采用水溶性碳化二亚胺(EDC)作为偶联剂,优化了抗原合成的多种反应条件,得到了多种结合比的2,4-

收稿日期: 2004-12-28; 修订日期: 2005-03-25

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA649160)

作者简介: 余若祯(1969~),女,博士研究生,主要研究方向为环境污染物的免疫检测技术, E-mail: yuruo Zheng00@mails.tsinghua.edu.cn

\* 通讯联系人

D-BSA 完全抗原. 首次通过 balb/c 小鼠的免疫试验评价不同结合比完全抗原的免疫性能, 为进一步制备 2, 4-D 单克隆抗体提供了技术支持.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

牛血清白蛋白 BSA 组分 V (Sigma A3294), 2, 4-D (北京化学试剂公司, 进口分装), 水溶性碳化二亚胺 EDC [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, Sigma E7750]. 多聚赖氨酸 PLL (Poly-L-lysine hydrochloride, Sigma P2658). 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂 (Gibco). HRP 酶标兔抗鼠 (国产). 紫外-可见分光光度计 (岛津 2401P). 电子感量天平 (Mettler-Toledo AL104). Balb/c 小鼠 24 只, 清洁级. 酶标仪 (Bio-Rad Model 550). 洗板机 (Bio-Rad Model 1575 Immunowash). 96 孔酶标板 (Greiner 655001). 微量移液器 (Gilson). 容量瓶. 透析袋.

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 抗原合成条件的优化

2, 4-D 在水中的溶解度很低, 采用偏碱性的磷酸盐缓冲溶液提高其溶解度. 首先, 2, 4-D 分子的羧基和 EDC 反应生成中间产物, 再与载体蛋白分子上的氨基酸残基反应形成酰胺键, 实现 2, 4-D 和 BSA 的偶联, 制备其完全抗原<sup>[9]</sup>. 该反应在水溶液中进行, 反应条件温和, 适于蛋白质和小分子半抗原的偶联反应. 因此本研究选择 EDC 法作为 2, 4-D 和载体蛋白 BSA 的偶联剂.

采用紫外吸收光谱法结合二元一次方程组测定计算偶联产物的结合比.

(1) 反应时间和温度对产物结合比的影响 大量的文献资料中, EDC 偶联反应分别采用 2 种不同的反应时间和温度<sup>[10, 11]</sup>. 第 1 种是 18 h 和 4℃, 第 2 种条件是 2 h 和 25℃. 这里比较这 2 种条件下 2, 4-D 和 BSA 的偶联反应的效率, 以便确定最适反应条件. 取 2 mL 浓度为 6 mg/mL 的 2, 4-D 的磷酸盐缓冲溶液, 加入 40  $\mu$ L 浓度为 50 mg/mL 的 BSA 溶液, 加入 7 mg EDC 同时轻轻搅拌. 分别在 4℃ 静置 18 h、25℃ 静置 2 h. 以 0.1 mol/L  $\text{NaHCO}_3$  溶液透析.

(2) 活化反应时间对产物结合比的影响 EDC 的功能是活化羧基. 如果载体蛋白的羧基被活化, 将和 2, 4-D 的羧基竞争 EDC, 从而降低偶联反应的效率. 为了提高反应效率, EDC 首先活化 2, 4-D 分子

的羧基基团, 然后再和 BSA 反应, 以便考察 2, 4-D 优先活化反应步骤及时间对产物结合比的影响<sup>[12]</sup>. 取 2.5 mL 浓度为 12 mg/mL 的 2, 4-D 的磷酸盐缓冲溶液, 调节 pH 为 6.5. 加入 15 mg EDC 后轻轻搅拌, 分别活化 0.25、15 和 30 min, 再加入 100  $\mu$ L 浓度为 50 mg/mL 的 BSA 溶液, 混合均匀, 在 4℃ 静置 18 h. 以 0.1 mol/L  $\text{NaHCO}_3$  溶液透析.

(3) pH 值对反应产物结合比的影响 pH 值是影响 EDC 反应活性的重要因素<sup>[13, 14]</sup>, 配制浓度为 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液, 调节 pH 值分别为 8.9、10、11、12. 配制 2, 4-D 浓度为 12 mg/mL 的溶液, 分别调节溶液的 pH 为 4.0、4.7、5.4、6.1 和 6.8. 在 2.5 mL 上述缓冲液中分别加入 100  $\mu$ L 浓度为 50 mg/mL 的 BSA 溶液, 再加入 15 mg EDC 同时轻轻搅拌. 4℃ 静置 18 h. 以 0.1 mol/L  $\text{NaHCO}_3$  溶液透析.

(4) pH 6.0 条件下 EDC 的加入量和产物结合比的关系 配制浓度为 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液, 调节 pH 值为 11.0. 以上述缓冲液配制 2, 4-D 浓度为 10 mg/mL 的溶液, 调节 pH 为 6.0. 在 2.5 mL 2, 4-D 溶液中分别加入 100  $\mu$ L 浓度为 50 mg/mL 的 BSA 溶液, 再分别加入 16、12、10、8 和 6 mg EDC, 同时轻轻搅拌. 4℃ 静置 18 h. 以 0.1 mol/L  $\text{NaHCO}_3$  溶液透析.

#### 1.2.2 完全抗原结合比对其免疫性能的影响

(1) 免疫剂量 采用结合比为 6:1、12:1、18:1 和 25:1 的完全抗原分别免疫 4 组小鼠, 每组 6 只. 初次免疫和加强免疫剂量均为 80  $\mu$ g/只. 以下以 M<sub>x</sub> 表示结合比为 x 的完全抗原免疫小鼠 (Mice) 获得的抗血清. Neg 表示阴性血清. 初次免疫采用弗氏完全佐剂乳化完全抗原. 加强免疫采用弗氏不完全佐剂乳化完全抗原.

(2) 免疫途径和周期 采用腹腔注射. 初次免疫后第 14 d 进行加强免疫. 随后 7~10 d 采血测定抗血清和包被抗原的反应性能<sup>[15]</sup>.

(3) ELISA 试验 采用间接 ELISA (酶联免疫吸附试验) 测定抗血清和包被抗原的反应性能<sup>[16]</sup>.

Balb/c 小鼠血清中存在各种物质的抗体, 同时具有半抗原、载体蛋白以及偶联剂 EDC 副产物的多种特异性抗体. ELISA 试验中以阴性血清 (Neg, 未免疫前 balb/c 小鼠血清) 作为对照. 判断被免疫的小鼠是否产生了免疫反应.

以多聚赖氨酸作为载体的 2, 4-D 包被抗原 (2, 4-D-PLL), 在一定程度上减小载体蛋白 BSA 的

特异性抗体对试验结果的干扰作用. 同时设计了以多聚赖氨酸为包被物的对照试验, 确定多聚赖氨酸和抗血清中抗体的非特异性反应程度. 通过上述对照试验可以确定抗血清中是否存在 2, 4-D 的特异性抗体.

采用反相竞争抑制 ELISA 试验 (2, 4-D/2, 4-D-PLL) 和间接 ELISA 试验 (2, 4-D-PLL) 对比. 反相竞争抑制 ELISA 试验中, 抗血清和过量游离的 2, 4-D 反应形成半抗原-抗体复合物. 包被抗原上的 2, 4-D 再从半抗原-抗体复合物中竞争其特异性抗体结合位点. 以试验结果的差别, 反映抗血清中 2, 4-D 特异性抗体的含量.

抗血清的初始稀释倍数为 400 倍, 以 4 倍为稀释梯度逐级稀释. 采用酶标仪测定 405nm 波长下的吸光度  $D_{405nm}$  值表示 ELISA 试验的结果.

## 2 结果与讨论

### 2.1 抗原合成条件的优化试验

#### 2.1.1 反应时间和温度对产物结合比的影响

反应时间 18 h、反应温度为 4℃ 条件下, 得到的反应产物结合比为 6. 反应时间 2 h、反应温度为 25℃ 条件下, 得到的反应产物结合比为 4. 试验结果表明第 1 种条件下, 产物具有相对较高的结合比. 因此选择反应时间为 18 h、反应温度为 4℃ 进行后续试验.

#### 2.1.2 活化反应时间对产物结合比的影响

从表 1 可以看出, 在 2, 4-D 和 EDC 相对于 BSA 都大大过量的条件下, 随着活化反应的时间的延长, 反应产物的结合比从 8 到 4 逐渐降低, EDC 的有效偶联反应率越来越低. 因为 EDC 的水解速率较高, 在 pH 为 5.0 和 7.0 的磷酸盐溶液中, 半衰期分别是 0.16 h 和 0.43 h. 因此不能采用预先活化 2, 4-D 的羧基的方式提高反应产物的结合比.

表 1 活化反应时间对产物结合比的影响对比

| 试验序号 | 活化反应时间 / min | 反应物摩尔比 BSA/EDC/2, 4-D | 产物结合比 2, 4-D/BSA |
|------|--------------|-----------------------|------------------|
| 1    | 0            | 1/1048/1819           | 8                |
| 2    | 2            | 1/1048/1819           | 7                |
| 3    | 5            | 1/1048/1819           | 6                |
| 4    | 15           | 1/1048/1819           | 5                |
| 5    | 30           | 1/1048/1819           | 4                |

#### 2.1.3 pH 值对反应产物结合比的影响

从表 3 可以看出, pH 4.0 的条件下, 在 2, 4-D 溶液中加入 BSA, 立即产生蛋白质的颗粒状沉降现象. 但是在弱碱性缓冲液透析之后, 产物的紫外扫描

曲线和 BSA 相比, 没有明显的变化. 所以产生的沉淀物是 2, 4-D 和 BSA 的氨基结合形成的内盐.

在 pH 4.7~6.1 的条件下, EDC 的偶联反应效率很高. pH 4.7~5.4 条件下, 大量 2, 4-D 结合到 BSA 表面, 导致 BSA 表面疏水性增强, 产生分散的凝胶样絮状物质. 其中 pH 5.4 条件下, 缓慢形成沉淀, 可以及时终止偶联反应. pH 6.1 试验条件下, 产物的结合比高达 26.

pH 提高到 6.8 时, 产物的结合比急剧下降到 7. 因此反应缓冲体系的 pH 对偶联反应效率的影响非常显著. 随着反应缓冲体系 pH 的提高, EDC 的水解速率也随之加快, 反应效率明显下降.

试验结果表明 2, 4-D 和 BSA 偶联反应较适宜的条件是 pH 5.4~6.1.

表 2 pH 值对反应产物结合比的影响

| 试验序号 | 2, 4-D 溶液的 pH | 反应物摩尔比 BSA/EDC/2, 4-D | 产物结合比 2, 4-D/BSA |
|------|---------------|-----------------------|------------------|
| 1    | 4.0           | 1/1048/1819           | 未加 EDC 即产生沉淀     |
| 2    | 4.7           | 1/1048/1819           | 加入 EDC 立即产生沉淀    |
| 3    | 5.4           | 1/1048/1819           | 加入 EDC 逐渐产生沉淀    |
| 4    | 6.1           | 1/1048/1819           | 26               |
| 5    | 6.8           | 1/1048/1819           | 7                |

#### 2.1.4 pH 6.0 条件下 EDC 的加入量和产物结合比的关系

本试验分别获得了结合比为 13、18、24、27 和 28 的完全抗原. EDC 的加入量低于 12 mg 时, 加入更多的 EDC 可以有效地提高 2, 4-D 完全抗原的结合比, 并且产物结合比和 EDC 的加入量具有一定的线性关系. EDC 的添加量超过 12 mg 时, 过量的 EDC 不能进一步有效地提高 2, 4-D 和 BSA 的结合效率. 结果见图 1.

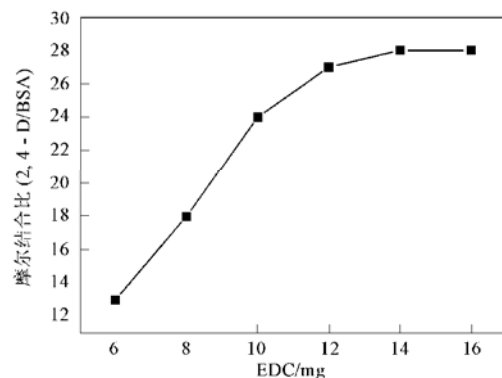


图 1 EDC 的加入量和产物结合比的关系

Fig. 1 Effect of EDC added weight and substitution degree of conjugates

## 2.2 不同结合比完全抗原免疫性能

### 2.2.1 结合比为 6:1 的完全抗原免疫血清 ELISA 试验结果

从图 2 可以看到, 抗血清和包被抗原反应的吸光度值比阴性血清高 1 倍多, 小鼠产生的免疫反应较弱. 包被抗原和包被多聚赖氨酸的抗血清反应曲线非常接近, 表明抗血清中的抗体基本上是载体蛋白 BSA 的抗体, 产生的 2, 4-D 的特异性抗体很少. 结合比为 6 的完全抗原不能有效地刺激小鼠产生 2, 4-D 的特异性抗体.

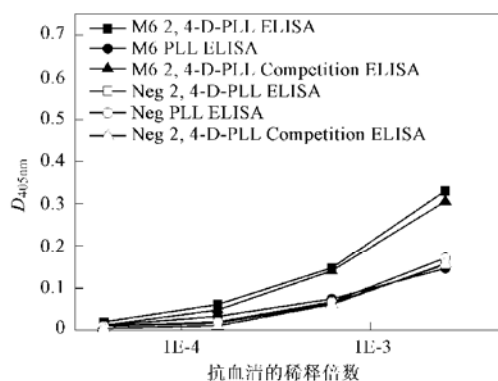


图 2 结合比为 6 的完全抗原免疫 balb/c 小鼠的抗血清 ELISA

Fig. 2 ELISA of the antiserum produced by complete immunogen of substitution degree 6

### 2.2.2 结合比为 12:1 的完全抗原免疫血清 ELISA 试验结果

从图 3 可以看出, 抗血清和包被抗原反应的吸光度值比阴性血清高 4 倍多, 表明小鼠产生了较强的免疫反应. 包被抗原和包被多聚赖氨酸的抗血清反应曲线有明显的差别, 表明抗血清中有 2, 4-D 的特异性抗体. 但是抗血清对多聚赖氨酸的非特异性吸附作用超过了阴性血清. 反相竞争抑制 ELISA 试验结果也表明抗血清中存在 2, 4-D 的特异性抗体. 结合比为 12 的完全抗原可以刺激小鼠大量产生 2, 4-D 的特异性抗体.

### 2.2.3 结合比为 18:1 的完全抗原免疫血清 ELISA 试验结果

从图 4 可以看出, 抗血清和包被抗原反应吸光度值比阴性血清高出 4 倍多, 小鼠产生很强的免疫反应. 包被多聚赖氨酸的 ELISA 反应性低于阴性血清, 表明抗血清中产生非特异性吸附的抗体少. 包被抗原和包被多聚赖氨酸的抗血清反应曲线的差别较大, 表明抗血清中 2, 4-D 的特异性抗体含量比较多.

反相竞争抑制 ELISA 试验的吸光度值低于结合比为 12 的完全抗原, 表明抗血清中 2, 4-D 特异性抗体的亲和力较强.

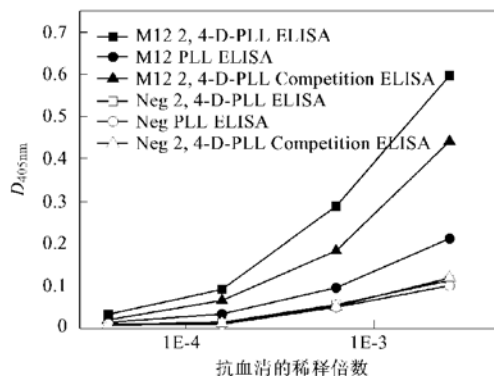


图 3 结合比为 12 的完全抗原免疫 balb/c 小鼠的抗血清 ELISA 试验

Fig. 3 ELISA of the antiserum produced by complete immunogen of substitution degree 12

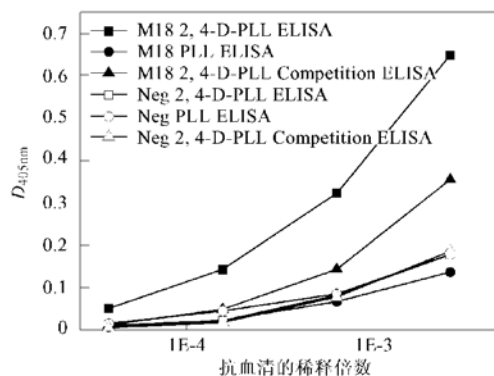


图 4 结合比为 18 的完全抗原免疫 balb/c 小鼠的抗血清 ELISA

Fig. 4 ELISA of the antiserum produced by complete immunogen of substitution degree 18

### 2.2.4 结合比为 25:1 的完全抗原免疫血清 ELISA 试验结果

从图 5 可以看到, 抗血清和包被抗原反应吸光度值和阴性血清相差不到 1 倍, 小鼠产生的免疫反应很弱. 包被抗原和包被多聚赖氨酸的抗血清反应曲线基本重合, 表明抗血清中的抗体基本上全没有 2, 4-D 的特异性抗体. 结合比为 25 的完全抗原不能有效地刺激小鼠产生免疫反应.

## 3 结论

(1) 水溶性碳化二亚胺(EDC)偶联 2, 4-D-BSA 的优化步骤是 2, 4-D-BSA 和 EDC 同时反应, 在 4℃

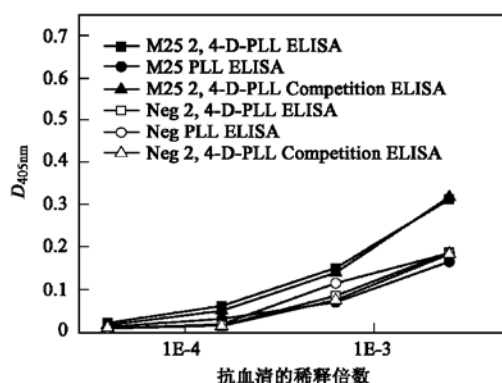


图 5 结合比为 25 的完全抗原免疫 balb/c 小鼠的抗血清 ELISA

Fig. 5 ELISA of the antiserum produced by complete immunogen of substitution degree 25

条件下反应 18 h, EDC 偶联反应的效率较高. 偶联反应在 2, 4-D 浓度为 10.0~12.0 mg/mL 的 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液中进行, 反应溶液的 pH 控制在 5.4~6.1 之间, EDC 的加入量在 12 mg 以下时, 增加 EDC 的加入量可以有效地提高产物的结合比, 产物结合比和 EDC 的加入量具有一定的线性关系.

(2) 实验动物抗血清 ELISA 试验结果表明, 结合比为 6 和 25 的完全抗原不能有效刺激免疫动物产生强烈的免疫反应. 结合比为 12 和 18 的完全抗原是性质良好的抗原, 能够刺激免疫动物大量产生 2, 4-D 的特异性抗体. 并且结合比为 18 完全抗原免疫动物产生的抗血清非特异性吸附低于阴性血清, 2, 4-D 特异性抗体含量高, 适于作为完全抗原免疫小鼠制备单克隆抗体.

#### 参考文献:

[1] Cox C. Herbicide fact sheet 2, 4-D: toxicology, part 1[J]. J. Pest. Reform, 1999, 19(1): 14~19.  
[2] Cox C. Herbicide fact sheet 2, 4-D: toxicology, part 2[J]. J. Pest. Reform, 1999, 19(2): 14~19.  
[3] 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.

[4] 《生活饮用水卫生规范》[S]. 中华人民共和国卫生部, 2001.  
[5] Dankwardt Andrea. Encyclopedia of Analytical Chemistry: Immunochemical Assays in Pesticide Analysis[M]. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 1996.  
[6] 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.  
[7] Knopp D, Nuhn P. Radioimmunoassay for 2, 4-dichlorophenoxyacetic Acid[J]. Arch. Toxicol., 1985, 58: 27~32.  
[8] Franek M, Kolar V, Granatova M, *et al.* Monoclonal ELISA for 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid: Characterization of Antibodies and Assay Optimization[J]. J. Agric. Food Chem., 1994, 42: 1369~1374.  
[9] Erlanger B F, Borek F, Beiser S M, *et al.* Steroid-Protein Conjugates: I. Preparation and Characterization of Conjugates of Bovine Serum Albumin with Testosterone and with Cortisone[J]. J. Bio. Chem., 1957, 228: 713~727.  
[10] Tatarinov B A, Cherenkevich S N, Komiak A I, *et al.* Study of temperature-dependent conformational changes in serum albumin using an adsorbed dye[J]. Mol. Biol. (Mosk), 1978, 12(1): 83~90.  
[11] María Soledad Celej, Guillermo G Montich, Gerardo D Fidelio, *et al.* Protein stability induced by ligand binding correlates with changes in protein flexibility[J]. Protein Science, 2003, 12: 1496~1506.  
[12] Maxime A Gilles, Antoine Q Hudson, *et al.* Stability of Water-Soluble Carbodiimides in Aqueous Solution[J]. Analytical Biochemistry, 1990, 184: 244~248.  
[13] Wrobel N, Schinkinger M, Mirsky V M, *et al.* A novel ultraviolet assay for testing side reactions of carbodiimides[J]. Anal. Biochem., 2002, 305(2): 135~138.  
[14] Chan V W, Jorgensen A M, Borders C L Jr, *et al.* Inactivation of bovine thrombin by water-soluble carbodiimides: the essential carboxyl group has a pK<sub>a</sub> of 5.51[J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1988, 151(2): 709~716.  
[15] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000. 18~22.  
[16] 余冰宾. 生物化学实验指导[M]. 北京: 清华大学出版社, 2004. 219~225.