

环戊二烯类有机氯农药单克隆抗体的制备及鉴定

肖陈贵¹, 顾大勇¹, 丁晶¹, 杨星星², 毕思远², 朱海², 岳振峰^{1*}, 侯乐锡¹

(1. 深圳市检验检疫科学研究院, 深圳 518045; 2. 广东省深圳市易瑞生物技术有限公司, 深圳 518102)

摘要: **目的** 制备并鉴定环戊二烯类有机氯农药单克隆抗体。**方法** 以环戊二烯类农药的特征部分为基础设计合成半抗原 4-(4,5,6,7,8,8-六氯-3a,4,7,7a-四氢-4,7-亚甲基-1H-聚-1-氧) 4-丁酮酸(CCD), 并通过活泼酯法将其与载体蛋白 BSA、OVA 分别偶联制备免疫抗原 CCD-BSA 和包被抗原 CCD-OVA; 再经过动物免疫、细胞融合、筛选、克隆, 得到 1 株能稳定分泌环戊二烯类农药抗体的单克隆细胞株。细胞株经扩大培养后, 注射小鼠体内产生腹水, 并将其用辛酸-硫酸铵和 protein A 柱子纯化出单克隆抗体。**结果** 用间接 ELISA 方法测定其效价为 2.5×10^4 , 亲和力 K_a 为 6.7×10^{10} L/mol; 以 β -硫丹为竞争物, 采用间接竞争 ELISA 法建立标准曲线, 测得其 IC_{50} 为 16.2 ng/mL, LOD 为 2.1 ng/mL, 定量检测线性范围为 4.7~117.5 ng/mL, 与其他 5 种结构类似物的交叉反应率高于 10%。**结论** 本研究成功获得了抗环戊二烯类农药单克隆抗体, 该抗体可实现果蔬中环戊二烯类农药的多残留快速检测。

关键词: 环戊二烯类农药; 间接 ELISA; 单克隆抗体

Preparation and identification of monoclonal antibody against chlorinated cyclodiene pesticide

XIAO Chen-Gui¹, GU Da-Yong¹, DING Jing¹, YANG Xing-Xing², BI Si-Yuan², ZHU Hai²,
YUE Zhen-Feng^{1*}, HOU Le-Xi¹

(1. Shenzhen Academy of Inspection and Quarantine, Shenzhen 518045, China;
2. Shenzhen Bioeasy Biotechnologies Co. Ltd., Shenzhen 518102, China)

ABSTRACT: Objective To prepare and identify a monoclonal antibody against chlorinated cyclodiene pesticide. **Methods** The hapten 4-(4,5,6,7,8,8-Hexachloro-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7-methano-1H-indenyl-1-oxy)4-Oxobutanoic Acid (CCD) was designed and synthesized on the basis of characteristics part of chlorinated cyclodiene pesticide, and artificial antigens CCD-BSA (immune antigen) and CCD-OVA (coating antigen) were prepared by coupling with the carrier proteins using active ester method. The monoclonal antibody (MAb) against chlorinated cyclodiene pesticide was produced by animal immunity, cell fusion, screening, and cloning. The MAb was prepared from ascitic fluids of Balb/c, which was purified with saturated ammonium sulfate followed by affinity chromatography on protein A. **Results** Indirect ELISA experiments showed that the titer of ascitic fluids was up to 2.5×10^4 , the affinity K_a was 6.7×10^{10} L/mol. The standard curve of β -endosulfan was established, and its IC_{50} was 16.2 ng/mL, LOD was 2.1 ng/mL, and linearity range was from 4.7 to 117.5 ng/mL. The cross reactivities of 5 similar structure analogues were higher than 10%. **Conclusion**

基金项目: 深圳市科技研发资金项目(JSGG20130624152620659, CXZZ2013032211211131)

Fund: Supported by Science Research Fund Program of Shenzhen (JSGG20130624152620659, CXZZ2013032211211131)

通讯作者: 岳振峰, 研究员, 博士, 硕士生导师, 主要研究方向为食品安全检测技术。E-mail: yuezhenfeng@163.com

*Corresponding author: YUE Zhen-Feng, Researcher, Food Inspection and Quarantine Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.1011, Fuqiang Road, Futian District, Shenzhen 518045, China. E-mail: yuezhenfeng@163.com

This research has successfully obtained the MAb against chlorinated cyclodiene pesticides, which could be used to detect multiple residues in fruits and vegetables.

KEY WORDS: chlorinated cyclodiene pesticides; ic ELISA ; monoclonal antibody

1 引言

环戊二烯类农药是一类常见的有机氯农药,它是一种广谱杀虫剂,曾被广泛应用于杀灭农业、林业、牧业和卫生害虫^[1,2]。此种化合物结构稳定,难氧化、难分解和毒性大,易溶于有机溶剂,尤其是在脂肪组织中,因此,它是高效、高毒和高残留农药,极易在环境中积累^[3]。有机氯农药通过生物富集和食物链进入人体和动物体,能在肝、肾、心脏等组织中蓄积引起中毒,损害运动中枢、小脑、脑干以及肝、肾和生殖系统,并具有一定的致癌活性,因此逐渐被禁止使用^[4]。但是由于其半衰期可达数天甚至数年之久,目前它在土壤、湖水、农副产品中的残留依然存在^[5,6]。

目前环戊二烯类农药主要采用气相、气-质等方法^[7,8]。这些方法虽然具有很好的准确度和很高的灵敏度,但需要昂贵的专门设备,且样品的前处理操作较繁琐,单个样品的检测时间很长,不能快速提供检测结果,一般作为实验室的精确检测方法而不能用于现场快速筛查。因此,有必要建立一种快速、灵敏、检测成本低的用于监控环戊二烯类农药残留的检测方法。本研究旨在制备针对可检测环戊二烯类农药的单克隆抗体,以此为核心试剂建立检测果蔬中环戊二烯类农药残留的免疫检测技术。

2 材料与方法

2.1 实验材料与仪器

2.1.1 主要试剂

辣根过氧化物酶(HRP)、牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(TMB)(美国 Sigma 公司); 环戊二烯类农药标准品(德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH), 其他化学试剂(阿拉丁试剂公司)均为分析纯。

2.1.2 实验动物及细胞

鼠骨髓瘤细胞 SP2/0(深圳市易瑞生物技术有限公司, 实验室保存); Balb/c 小鼠, 雌性, 7~8 周龄, 体重 20~22 g(广东省实验动物中心)。

2.1.3 仪器

酶标板自动洗涤机(美国 Bio-tech); 液质联用仪(美国 AB); 酶标仪(美国 Thermo); 倒置显微镜(日本 Olympus); 二氧化碳培养箱(美国 Thermo)。

2.2 实验方法

2.2.1 半抗原的合成及结构鉴定^[9]

称取六氯环戊二烯 20 g 于圆底三口烧瓶中, 将其加热至 80 ℃ 左右, 用常压滴液漏斗缓慢滴加 14 mL 环戊二烯, 加毕再反应大约 20 min, 待温度冷却后有晶体析出, 将产物用硅胶柱纯化, 得到白色结晶即中间体 1。

称取 5 g 中间体 1, 2 g SeO₂, 用 20 mL 冰乙酸溶解后回流反应 3 h, 将 SeO₂ 过滤, 蒸干冰乙酸, 将产物用硅胶柱纯化, 得到中间体 2。

称取 500 mg 中间体 2, 300 mg 丁二酸酐, 30 mL 无水吡啶, 回流反应 4 h, 蒸干溶剂; 用 50 mL 乙酸乙酯溶解, 加饱和食盐水水洗 3 遍, 每遍 20 mL, 之后将有机相用无水硫酸钠干燥, 蒸干用硅胶柱纯化, 得到终产物 3, 即 CCD, 如图 1 所示。

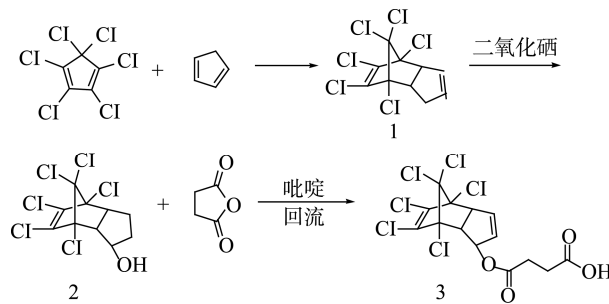


图 1 环戊二烯类农药半抗原 CCD 的合成路线

Fig. 1 The synthesis scheme of CCD hapten

将上述合成的目标物 CCD 经液相-质谱联用(LC-MS)测定, 如图 2 所示, 从图中可知该物质的分子离子峰为 452.8[M-H]⁻, 且该分子离子峰旁有一系列同位素峰 450.8, 456.9, 458.9 等, 这些峰均与该化合物的分子量相符。

2.2.2 人工抗原的制备及鉴定

称取半抗原 CCD 0.1 mmol 溶于 0.5 mL N,N-二

甲基甲酰胺(DMF)中, 搅拌加入 0.2 mmol 二环己基碳二亚胺(DCC)和 0.2 mmol N-羟基琥珀酰亚胺(NHS), 4 °C 下磁力搅拌反应过夜, 4000 r/min 离心 5min 后取上清液为 A 液; 称取适量 BSA 或 OVA(半抗原与 BSA 或 OVA 的摩尔比大约为 30:1)溶于适量的磷酸盐缓冲液 PBS(10 mmol/L, pH7.4)中, 搅拌溶解制备 B 液。磁力搅拌下, 将 A 液逐渐滴入 B 液中, 4 °C 下反应 12 h。离心后, 取上清液, 4 °C 下用 PBS 透析 3 d, 每天更换 3 次透析液, 即可获得免疫原 CCD-BSA, 包被原 CCD-OVA。

根据紫外扫描结果(见图 3), 半抗原与 BSA、OVA 的偶联物与载体蛋白的最大吸收峰相比, CCD-BSA 波峰处 OD 明显增大, 波谷稍偏移至 250 nm, OD 明显增高, 300~320 nm 仍有吸收; CCD-OVA 波峰偏移至 281~283 nm, OD 明显增大, 300~320 nm 仍有吸收发生了明显的变化, 表明半抗原与载体蛋白成功地发生了偶联^[10]。

2.2.3 免疫方案

取 7~8 周龄 Balb/c 雌性小鼠, 将制备的免疫抗

原与弗氏完全佐剂等量混合, 完全乳化后, 腹部皮下注射, 剂量为含 CCD-BSA 100 μg, 以后每隔三周以同剂量取人工抗原与弗氏不完全佐剂混合乳化后皮下多点注射, 免疫四次后测定其效价和抑制率, 选取效价和抑制率都较高的小鼠进行细胞融合, 融合前 3 d 加倍剂量强化免疫一次^[11]。

2.2.4 细胞融合和单克隆抗体制备

将小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞与脾细胞以 5:1 的比例混合, 在 50% PEG 下融合, 洗涤、离心后以 HAT 培养基悬浮, 接种于含饲养细胞的 96 孔培养板中, 在 37 °C 5%的 CO₂ 培养箱中培养 3 d 后以 HAT 培养基换液, 第 10 d 换成 HT 培养基。待板内细胞长至培养孔面积的 1/3 时, 间接 ELISA 法筛选细胞阳性孔, 筛选时以 CCD-OVA 作为包被抗原。阳性孔进一步用间接 ELISA 鉴定筛选, 有限稀释法克隆至大约每孔 <1 个细胞, 10 d 后检测为阳性且竞争较好的单克隆孔所得细胞株即为分泌单克隆抗体的细胞株。杂交瘤细胞扩大培养后, 用于腹水制备。

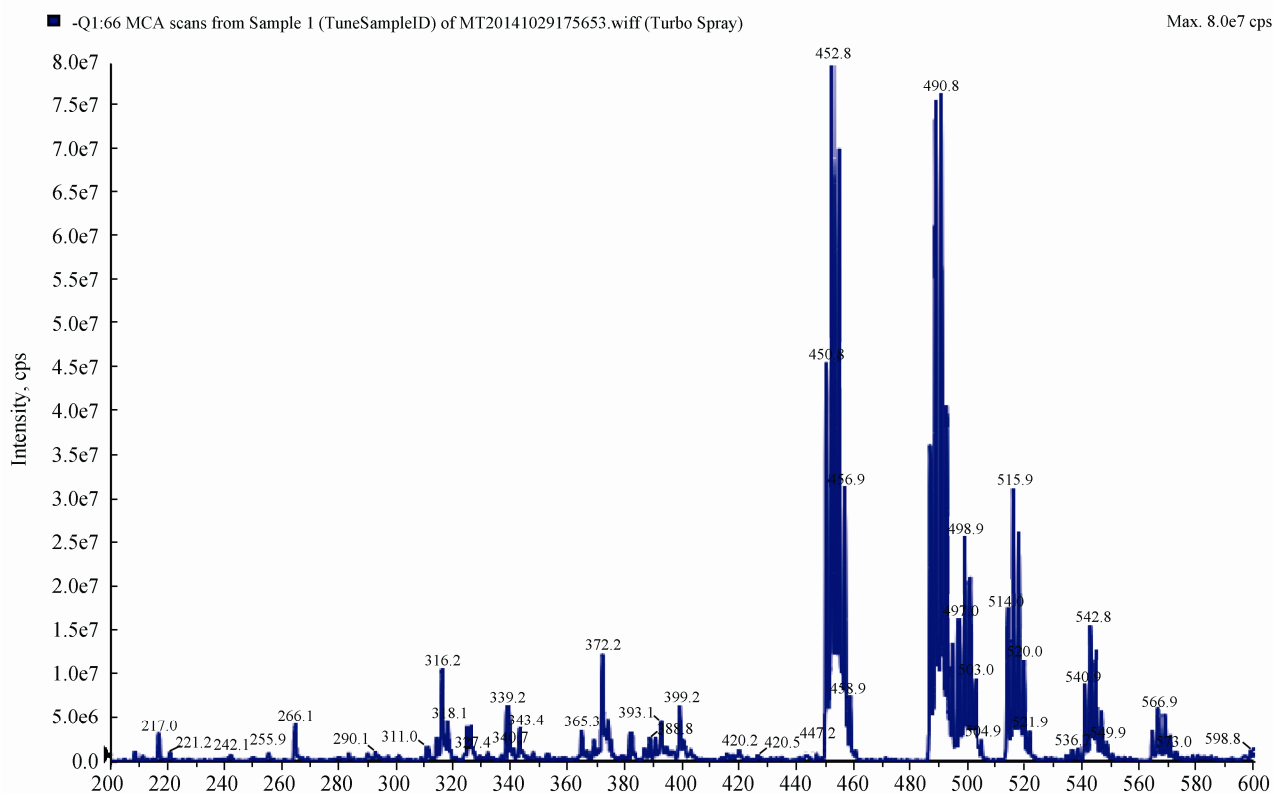


图 2 环戊二烯类农药半抗原 CCD 的质谱图

Fig. 2 The MS of CCD hapten

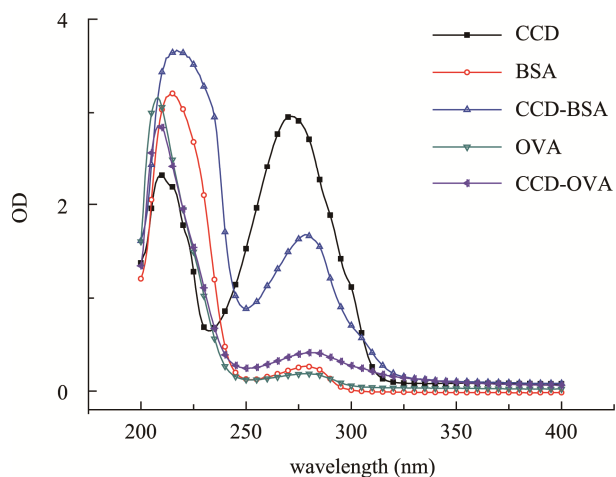


图3 CCD人工抗原紫外扫描谱图

Fig. 3 UV spectrum of CCD artificial antigens and haptens

2.2.5 腹水的制备和纯化

Balb/c 小鼠腹腔注射降植烷, 3 mL/只, 7~10 d 后于每只小鼠腹腔注射阳性克隆的杂交瘤细胞 $(1\sim2)\times10^8$ 个/mL。待小鼠腹部长大后抽取腹水, 离心取上清, 采用饱和硫酸铵沉淀法除去杂蛋白, 再过 protein A 柱子纯化出 IgG, 并采用 *Bradford* 法检测蛋白浓度^[12]。

3 结果与分析

3.1 半抗原的合成

一般来说, 农药等分子量小于 1000 Da 的有机小分子物质不具有免疫原性, 只有将其用末端含有活性基团的间隔手臂与 OVA、BSA 等大分子蛋白偶联后形成完全抗原, 才能有效地诱导机体产生特异性免疫应答^[13]。本实验合成的针对环戊二烯类农药的半抗原, 将其六氯环戊二烯特异性部分充分的暴露出来, 在非特异性的部位引入带有羧基的手臂, 来增强诱导机体产生特异性抗体的能力及获得多特异性的抗体。

3.2 杂交瘤细胞的筛选

采用间接 ELISA 方法检测细胞培养上清中抗体的分泌情况, 选择其中呈强阳性反应的细胞孔以硫丹、狄试剂、艾氏剂、七氯、氯丹分别作为竞争物进行间接 ELISA, 最后筛选 5~6 个较理想的阳性孔, 对这 5~6 个阳性孔进行有限稀释法克隆, 最终获得 1 株能稳定分泌同时针对以上几种药物的杂交

瘤细胞。

3.3 抗体的效价及亲和力的测定

抗体的效价采用间接 ELISA 测定, 分别以不同浓度的包被抗原包被酶标板, 把纯化好的抗体倍比稀释, 本文规定抗体效价为抗体 $A_{450\text{nm}}\approx 1.0$ 左右时的抗体的稀释倍数^[14]。采用方阵滴定法优化包被抗原浓度和抗血清工作浓度, 选择吸光值为 1.0 左右时的抗原浓度和抗体稀释度作为工作浓度。经测定, 抗体纯化后其效价为 2.5×10^4 。其亲和力的测定^[15], 以 125 ng/mL CCD-OVA 包被, 采用间接 ELISA 测定并取曲线趋于平坦段 $A_{450\text{nm}}$ 值 50%处所对应的抗体浓度为 EC_{50} , 结果如图 4 所示, 以其倒数作为亲和常数(K_a), 计算获得 K_a 为 6.7×10^{10} L/mol。

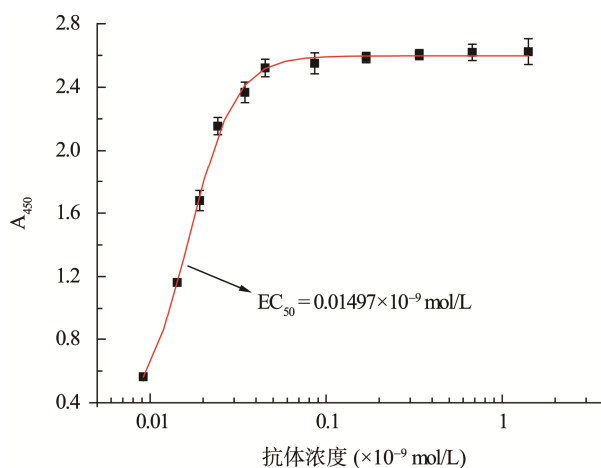


图4 抗体亲和力常数曲线

Fig. 4 Affinity constant curves of monoclonal antibodies

3.4 单抗的灵敏度的测定

对获得的抗体纯化后进行间接 ELISA 实验^[16], 采用 Originlab 7.5 的四参数拟合模块对间接竞争 ELISA 反应曲线进行 S 拟合, 计算曲线 IC_{50} 值, 以 CDD-OVA 为包被原, 灵敏度较高的 β -硫丹为竞争物, 建立间接 ELISA 标准曲线 (见图 5), 其 $IC_{50}=16.2$ ng/mL, LOD 为 2.1 ng/mL, 定量检测线性范围为 4.7~117.5 ng/mL。

3.5 抗体特异性的测定

抗体特异性是以交叉反应率(cross-reactivity, CR)来表示的。交叉反应率可通过测定抗体对药物的灵敏度(用半抑制浓度表示, IC_{50})来确定, 以一个检测对

象作为对照(CR 设为 100%)。本文以抗体对 β -硫丹的 IC_{50} 值作为对照, 抗体对其他药物的交叉反应计算如以下公式所示:

交叉反应率(%) = $\frac{IC_{50}(\text{硫丹})}{IC_{50}(\text{竞争物})} \times 100\%$

通过表 1 的交叉反应可以看出该抗体具有较宽的特异性, 对 β -硫丹、狄试剂 2 个药物的交叉反应率高于 100%, 对 α -硫丹、艾氏剂、七氯、顺式-氯丹 4 个药物的交叉反应率再 10%~100%之间, 而对反式-氯丹的交叉反应率低于 10%, 说明半抗原的结构设计与获得抗体质量存在直接关联。

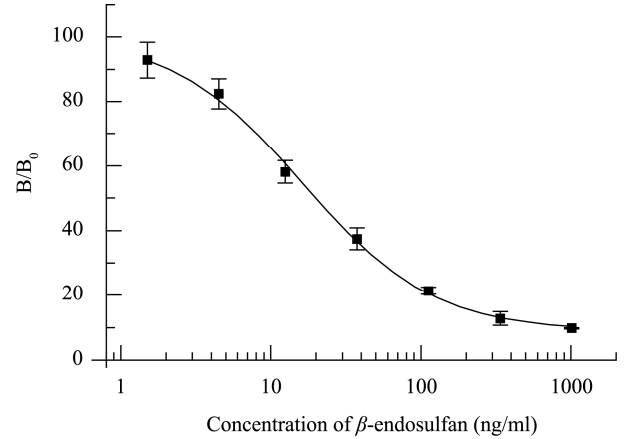


图 5 β -硫丹的间接 ELISA 标准曲线
Fig. 5 The icELISA standard curve of β -endosulfan

表 1 单克隆抗体与 β -硫丹类似物的交叉反应率
Table 1 Cross reactivity of monoclonal antibody with analogous compound of β -endosulfan

化合物	分子结构	$IC_{50}/(\mu g/L)$	CR(%)
β -硫丹		16.2	100
α -硫丹		43.2	37.5
狄试剂		15.6	103.9
艾氏剂		98.5	16.5
七氯		105.1	15.4
顺式-氯丹		120.4	13.5
反式-氯丹		214.3	7.6

4 讨论

本实验通过半抗原、人工抗原合成、动物免疫、细胞融合和筛选、克隆等得到了稳定分泌抗环戊二类农药单克隆抗体的细胞株,抗体对这些结构类似物均有较好的交叉反应率,以实现环戊二类农药的多残留检测。本方法可用于研制各种免疫快速检测试剂,对进一步研究农药等小分子化合物具有重要意义。

参考文献

- [1] Hargrave BT, Harding GC, Vass WP, *et al.* Organochlorine pesticides and poly-chlorinated-biphenyls in the Arctic-ocean food web [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1992, 22: 41–54.
- [2] Arnold SF, Klotz DM, Collins BM, *et al.* Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals [J]. *Sci*, 1996, 272: 1489–1492.
- [3] Chen Y, Wang C, Wang Z. Residues and source identification of persistent organic pollutants in farmland soils irrigated by effluents from biological treatment plants [J]. *Environ Int*, 2005, 31(6): 778–783.
- [4] Ames BN, Gold LS. Environmental pollution, pesticides, and the prevention of cancer: Misconceptions [J]. *FASEB J*, 1997, 11: 1041–1052.
- [5] Liu GZ, Wang S, Liu JQ, *et al.* An electrochemical immunosensor based on chemical assembly of vertically aligned carbon nanotubes on carbon substrates for direct detection of the pesticide endosulfan in environmental water [J]. *Anal Chem*, 2012, 84 (9): 3921–3928.
- [6] Mancluas JJ, Abad A, Lebedev MY. Development of a monoclonal immunoassay selective for chlorinated cyclodiene insecticides [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 2776–2784.
- [7] Hernández F, Sancho JV, Pozo OJ. Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 382(4): 934–946.
- [8] 柯常亮, 林钦, 甘居利, 等. 气相色谱法测定养殖环境沉积物中硫丹及代谢物残留[J]. *光谱实验室*, 2011, 28(2): 551–555
Ke CL, Lin Q, Gan JL, *et al.* Determination of endosulfan and its metabolites residues in sediments in aquacultural environment by gas chromatography [J]. *Chin J Spect Lab*, 2011, 28(2): 551–555
- [9] Lee N, Skerritt JH, McAdam DP. Hapten synthesis and development of ELISAs for detection of endosulfan in water and soil [J]. *J Agric food Chem*, 1995, 43, 1730–1739
- [10] Singh KV, Kaur J, Varshney GC, *et al.* Synthesis and characterization of hapten-protein conjugates for antibody production against small molecules [J]. *Bioconjugate Chem*, 2004, 15(1): 168–173.
- [11] Lee WY, Lee EK, Kim YJ, *et al.* Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of the organophosphorus insecticide isofenphos [J]. *Anal Chim Acta*, 2006 (557): 169–178
- [12] 李娟, 张耀庭, 曾伟, 等. 应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2000, 13(2): 118–120.
Li J, Zhang YT, Zeng W, *et al.* The determination of total protein content by Bradford method [J]. *Chin J Biolog*, 2000, 13(2): 118–120.
- [13] 王硕, 张鸿雁, 王俊平. 酶联免疫吸附分析方法[M]. 北京: 科学技术出版社, 2011: 16–20.
Wang S, Zhang HY, Wang JP. Enzyme-linked immunosorbent analysis method [M]. Beijing: Science and Technology Press, 2011: 16–20.
- [14] 杨少国, 胡少昶, 魏华平. 酶免疫检测技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998: 43–44.
Yang SG, Hu SC, Wei HP. Enzyme immunoassay detection technology [M]. Nanjing: Nanjing University Press, 1998: 43–44.
- [15] Bobrovnik SA. Determination of antibody affinity by ELISA theory [J]. *J Biochem Biophys Method*, 2003, 57: 213–236.
- [16] 郭积燕. 免疫学检验中的酶免疫技术[J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(2): 221–224.
Guo JY. Enzyme immunoassay technology in immunology test [J]. *Chin J Lab Med*, 2005, 28(2): 221–224.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



肖陈贵, 本科, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: aeiouou@139.com



岳振峰, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品质量安全检测。
E-mail: yuezhenfeng@163.com