

# 丁草胺人工抗原及抗体制备研究

雷红涛, 肖治理, 方坚生, 沈玉栋, 刘文字, 孙远明\*, 冯伟雯

(广东省教育厅食品质量安全重点实验室, 华南农业大学食品安全研究所, 广东 广州 510642)

**摘要:** 以除草剂丁草胺、巯基丙酸为原料, 合成丁草胺半抗原, 用氢核磁共振、电喷雾质谱、红外光谱方法进行鉴定; 通过活泼酯法将半抗原与载体蛋白偶联制备丁草胺人工抗原, 用紫外光谱法对其鉴定; 免疫动物后, 间接竞争 ELISA 检测鉴定抗体。结果表明, 巯基丙酸与丁草胺连接生成半抗原, 半抗原被连接到载体蛋白上, 丁草胺人工抗原合成成功, 获得了丁草胺小鼠抗血清。棋盘滴定法确定包被抗原工作浓度为  $3 \mu\text{g/ml}$ , 抗血清稀释倍数为 32000 倍。建立了间接竞争 ELISA 标准曲线, 丁草胺  $\text{IC}_{50}$  为  $1.44 \mu\text{g/ml}$ , 检测限为  $0.47 \mu\text{g/ml}$ 。

**关键词:** 丁草胺; 人工抗原; 抗血清

## Preparation of Artificial Antigen and Antibody for Butachlor

LEI Hong-tao, XIAO Zhi-li, FANG Jian-sheng, SHEN Yu-dong, LIU Wen-zi, SUN Yuan-ming\*, FENG Wei-wen  
(Key Laboratory of Food Quality and Safety, Education Department of Guangdong Province, Institute of Food Safety,  
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Butachlor was used to react with 3-mercaptoacetic acid to synthesize the hapten, and the structure of the hapten was identified by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance, electro-spray ionisation mass spectrometry and infrared spectrometry, respectively. Then, artificial antigen was prepared by modified active ester method, and the conjugate was identified by ultraviolet spectrometry. Finally, the specificity of the antiserum was confirmed by indirect competitive ELISA. The results showed that 3-mercaptoacetic acid is linked to butachlor, the hapten linked to carrier protein, the artificial antigen synthesized, and antiserum

收稿日期 2006-07-03

\*通讯作者

基金项目: 国家自然科学基金项目(20377016); 广东省自然科学基金项目(032240);

粤满仓关键领域重点突破项目(2006A25005002)

作者简介: 雷红涛(1973-), 男, 副教授, 博士, 主要从事有害物残留免疫分析研究。

观察色素颜色变化, 并在  $510 \text{ nm}$  处测其吸光度。结果表明, 柠檬酸会使色素颜色稍微变浅; 而食盐和蔗糖对色素颜色几无影响。故该色素对蔗糖和柠檬酸等食品添加剂稳定性较好。

### 3 结论

3.1 热水浸提所得的山核桃(宁国)外果皮色素呈酒红色, 且随着浓度的增加颜色加深, 浓缩至较大浓度时颜色为棕褐色, 有点植物的清香味; 溶解性良好; 为混合物;  $\text{pH}$  对色素影响较大, 光、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、对色素有一定影响,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、柠檬酸对色素影响较小, 温度、食盐、蔗糖对色素几乎无影响, 乙醇对色素有增色效应。

3.2 宁国山核桃外果皮色素是一种有开发前景的食用色素。

### 参考文献:

- [1] 贺士元. 河北植物志[M]. 石家庄: 河北科学出版社, 1986: 249-252.
- [2] 章亭洲. 山核桃的营养、生物学特性及开发利用现状[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(4): 90-93.
- [3] 周靖, 尹永彪, 邵艳秋. 山核桃青果皮中矿物元素的测定[J]. 牡丹江师范学院学报, 2001(4): 19-20.
- [4] 罗勤贵. 核桃系列综合深加工[J]. 食品科学, 1994, 15(12): 56-58.
- [5] 吕俊芳, 张美丽, 刘启瑞, 等. 核桃外果皮中棕褐色色素的提取及性质测试[J]. 化学研究与应用, 2001, 13(4): 387-390.
- [6] 许泽宏, 谭建红, 张霞, 等. 核桃外皮天然食用色素的提取与理化性质[J]. 四川师范大学学报, 2006, 29(4): 488-490.
- [7] 张水华. 食品分析实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 34.
- [8] 刘长虹. 食品分析实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 93.
- [9] 李桂华. 油料油脂检验与分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 111-115.
- [10] 许牡丹, 毛跟年. 食品安全性与分析检测[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 196.

against butachlor obtained. Chessboard titer method gives the optimal coating antigen concentration  $3 \mu\text{g/ml}$  and 32000 fold dilution of antiserum. The calibration curve of indirect competitive ELISA showed that the  $\text{IC}_{50}$  is  $1.44 \mu\text{g/ml}$  and detection limit  $0.47 \mu\text{g/ml}$ .

**Key words** butachlor; artificial antigen; antiserum

中图分类号: R392.11; TS207.53

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0067-05

近年来,除草剂在我国用量逐年增加,极大地降低了劳动强度,提高了农业生产效率。但是,有的除草剂在环境中稳定性强,残留期长,表露出一定危害性,从而逐渐引起人们的关注<sup>[1-2]</sup>。丁草胺(butachlor),化学名称为2-氯-N-(2,6-二乙基苯基)-N-(丁氧甲基)乙酰胺,是我国目前生产和使用量最大的除草剂品种之一,其残留可通过食物链进入动物体或人体,并表现出一定的致突变性<sup>[3]</sup>。欧盟经过两个较长阶段的审查后,已经从2004年1月1日起取消了丁草胺在其境内的登记<sup>[4]</sup>。

色谱方法准确、灵敏,是丁草胺分析的常规方法,但检测设备昂贵,需专业操作人员,并且样品前处理繁琐,耗时费力,很难适应批量样品快速检测的要求。上世纪90年代后发展起来的农药免疫分析技术,简单、快速、灵敏、特异,是目前农药残留快速检测重要技术之一。丁草胺免疫分析目前研究甚少<sup>[5]</sup>,本研究采用3-巯基丙酸(3-MPA)为衍生剂,探讨丁草胺人工抗原两步合成方法,并利用所得抗原免疫动物,获得高效价的抗丁草胺血清。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂

丁草胺(94.2%) 山东滨州农药厂; 3-MPA(99%)、弗氏佐剂、二环己基碳二亚胺(DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) Sigma公司; 牛血清蛋白(BSA)、卵清白蛋白(OVA) 上海伯奥生物技术有限公司; 羊抗小鼠IgG-HRP 武汉博士德生物工程有限公司; 其他试剂皆为市售A R 级; 磷酸盐缓冲液(PBS)、包被液、洗涤液(PBST)、封闭液、邻苯二胺底物溶液、终止液均按文献方法配制<sup>[6]</sup>。

#### 1.1.2 仪器与设备

2550紫外-可见分光光度计 Shimadzu公司; DRX-400核磁共振仪 BRUKER公司; LCQDECA液质联用仪 Finnigan公司; RFX-65A傅立叶变换红外光谱仪 Analect公司; 6K-15高速冷冻离心机 Sigma-Satorius公司; MK-2洗板机、MK-3酶标仪 Thermo Labsystems公司; 透析袋(最大截留分子量6000D) 进口分装; 96孔聚苯乙烯酶标板 深圳金灿华有限公司。

#### 1.1.3 动物

Balb/c小鼠由中山大学动物实验中心提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 丁草胺半抗原的合成与鉴定

搅拌状态下将170mg丁草胺、62mg 3-MPA、0.11g KOH依次加入10ml乙醇中,回流4h,过滤,减压脱溶得丁草胺半抗原(BMPA)粗品,用8ml 5%的 $\text{NaHCO}_3$ 溶解粗品,然后用6mol/L的HCl调pH至3.0,乙酸乙酯萃取(5ml  $\times$  3),合并有机相,水洗(20ml  $\times$  3),有机相用无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,在 $20 \times 20\text{cm}$ 的薄板上薄层层析(展开剂苯:1,4-二氧六环:冰乙酸=90:10:1),将 $R_f=0.52$ 处物质刮下,乙醇提取,减压脱溶,即得BMPA纯品,收率约为68%。纯化后的BMPA采用氢核磁共振( $^1\text{H NMR}$ )、电喷雾质谱(ESI-MS)、红外光谱(IR)确证结构。

#### 1.2.2 丁草胺人工抗原的合成与鉴定

采用活泼酯法<sup>[7]</sup>将BMPA与BSA偶联制备出免疫原BMPA-BSA,将BMPA与OVA偶联制备包被抗原BMPA-OVA。紫外光谱法鉴定并计算偶联比<sup>[8]</sup>,考马斯亮兰法测定蛋白浓度<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.3 动物免疫

将BMPA-BSA用生理盐水稀释,加等体积弗氏完全佐剂充分乳化,在Balb/c小鼠的足垫进行皮下注射,免疫剂量为 $0.1\text{mg/只}$ 。三周后加强免疫,免疫剂量同基础免疫,改用弗氏不完全佐剂,每三周加强免疫一次。从第三次加强免疫开始,免疫后第8~10d采集尾血,棋盘滴定法确定包被抗原工作浓度和抗血清稀释度<sup>[7-8]</sup>,间接竞争ELISA法进行检测。

#### 1.2.4 丁草胺标准溶液配制

用1,4-二氧六环将丁草胺配制成2000、200、20、2、0.2、0.02、0mg/ml等系列浓度的母液,临用前再用蒸馏水将每个浓度的母液分别稀释200倍后作为工作液。

#### 1.2.5 间接竞争ELISA(cELISA)操作

①包被:以 $3 \mu\text{g/ml}$ 的BMPA-OVA包被酶标板,每孔 $100 \mu\text{l}$ , $37^\circ\text{C}$ 水浴温育2h, $4^\circ\text{C}$ 过夜。②封闭:取出洗涤三次,每次静置3min,甩干,用3%脱脂奶粉进行封闭,每孔 $200 \mu\text{l}$ , $37^\circ\text{C}$ 水浴温育1h;③竞争反应:甩干,洗涤三次,取包被有BMPA-OVA的板条一列,每孔加入不同浓度的丁草胺标准溶液和32000倍稀释的小鼠抗血清各 $60 \mu\text{l}$ ,再重复两列,置 $37^\circ\text{C}$ 水浴温育1h;⑤抗体与酶标二抗反应:洗涤三次后拍干,

加入一定浓度羊抗小鼠 IgG-HRP，每孔 100 μl，37℃ 水浴中温育 1 h。⑥显色：洗涤三次拍干，加入邻苯二胺底物溶液，每孔 100 μl，室温避光显色 15min；⑦终止、测量：向每孔中加入 50 μl 终止液，测读各孔 A<sub>492nm</sub> 值。

1.2.6 数据处理和曲线拟合

采用 Origin 7.0 软件的四参数对数函数 (1) 对 ELISA 数据进行处理和曲线拟合 [5-6]。

$$y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D \quad (1)$$

式中，A 为曲线渐进线最大值，等于 0 浓度时的吸光度，即 A<sub>max</sub>；B 为曲线回折点处的斜率，即 50% 的 A<sub>max</sub> 在曲线上对应点的斜率；C 为曲线回折点对应的 x 值，等于 50% 的 A<sub>max</sub> 所对应的药物浓度，即 IC<sub>50</sub>；D 为曲线渐进线最小值，等于背景值，即 A<sub>min</sub>。绘制标准曲线时，横坐标为丁草胺浓度，采用对数刻度，纵坐标为结合率 (A - A<sub>min</sub>) / (A<sub>max</sub> - A<sub>min</sub>)，A 为各浓度下的 A<sub>492nm</sub> 值。

2 结果与分析

2.1 半抗原的结构鉴定

将经过纯化的半抗原 BMPA 进行 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.103~7.297 (m, 3H, ArH)、4.942 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>N)、3.553~3.617 (t, 2H, CH<sub>2</sub>O)、2.902 (s, 2H, CH<sub>2</sub>S)、2.812 (s, 2H, SCH<sub>2</sub>)、2.505~2.614 (m, 6H, 3CH<sub>2</sub>)、1.478~1.515 (t, 2H, CH<sub>2</sub>)、1.275~1.331 (q, 2H, CH<sub>2</sub>)、1.151~1.227 (m, 6H, 2CH<sub>3</sub>)、0.845~0.893 (m, 3H, CH<sub>3</sub>)。正离子模式电喷雾质谱分析后，[M+1]<sup>+</sup>=382 处有一个分子离子峰 (图 1)，与分子量为 381 的目标产物 BMPA 一致。IR 分析发现 (图 2)，1659 cm<sup>-1</sup> 和 1711 cm<sup>-1</sup> 出现两个 -C=O 特征吸收峰，而丁草胺分子只有一个 -C=O，而且 3400 cm<sup>-1</sup> 出现 -COOH 的 -OH 特征吸收，由此可判断 BMPA 中有 -COOH 存在；另外 700 cm<sup>-1</sup> 出现 1 个强峰，1400 cm<sup>-1</sup> 到 1600 cm<sup>-1</sup> 间出现两个中峰，可判断出有苯的 1、2、3 位取代物存在；1100 cm<sup>-1</sup> 到 1200 cm<sup>-1</sup> 出现 ROR' 醚键特征峰；1182.8 cm<sup>-1</sup>

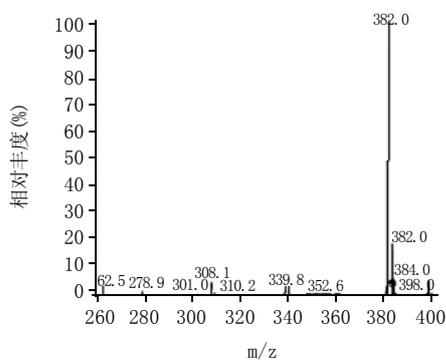


图 1 BMPA 的 ESI-MS

Fig.1 ESI mass spectrum of BMPA

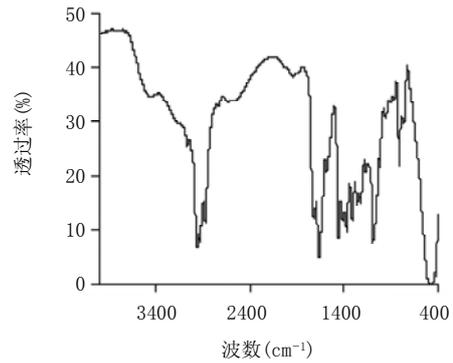


图 2 BMPA 的红外光谱

Fig.2 Infrared spectrum of BMPA

出有 RNR'R' 叔胺特征峰，这些特征与丁草胺的结构相符。综上核磁共振、质谱和红外分析，可判断丁草胺半抗原 BMPA 合成成功。

2.2 人工抗原的紫外光谱法鉴定

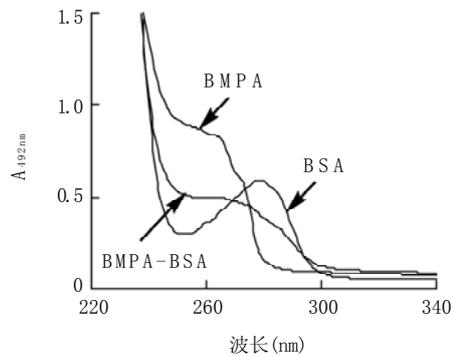


图 3 BMPA-BSA 与 BMPA 和 BSA 紫外吸收

Fig.3 UV absorption spectrum of BMPA-BSA and BMPA and BSA

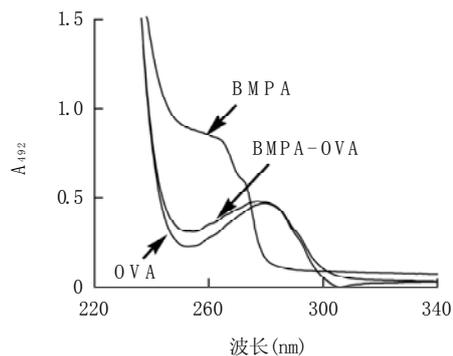


图 4 BMPA-OVA 与 BMPA 和 OVA 紫外吸收

Fig.4 UV absorption spectrum of BMPA-OVA and BMPA and OVA

图 3、4 分别为免疫抗原 BMPA-BSA 和包被抗原 BMPA-OVA 与半抗原和载体蛋白的紫外扫描对照图。从图 3 中可见 BMPA 在 260 nm 左右有强吸收，BSA 在 280 nm 有强吸收，而 BMPA-BSA 在 260 nm 和 280 nm 都

表现出有一定吸收,其吸收曲线既不同于BSA也不同于BMPA的吸收曲线,是一种BSA和BMPA的累加吸收特征。因为透析后不存在游离的BMPA,所以这种累加的吸收特征为BMPA-BSA偶合物所贡献出,而非游离BMPA和BSA累加贡献,从而说明人工抗原BMPA-BSA合成成功<sup>[8]</sup>。同理,也可推断出BMPA-OVA合成成功。

根据文献方法<sup>[8]</sup>计算出BMPA-BSA的偶联比为11.2,透析后所得偶合物的蛋白浓度为5.99mg/ml;BMPA-OVA的偶联比8.9,透析后所得偶合物的蛋白浓度为2.20mg/ml。OVA浓度偏低,主要是因为偶联反应和透析中部分蛋白发生变性,沉淀损失所致。

### 2.3 棋盘滴定

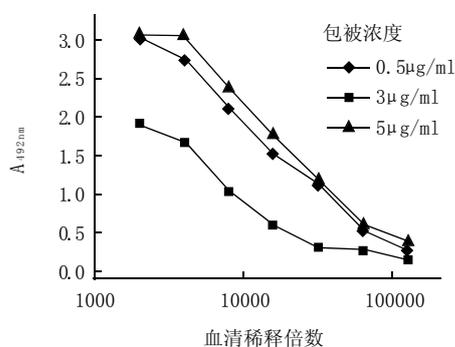


图5 抗血清棋盘滴定曲线  
Fig.5 Chessboard titer curve of antiserum

图5是小鼠抗血清的棋盘滴定曲线。从图中可以看出,0.5 μg/ml包被,血清稀释倍数8000倍时, $A_{492nm}=1.037$ ;3 μg/ml包被,血清稀释倍数32000倍时, $A_{492nm}=1.123$ ;5 μg/ml包被,血清稀释倍数32000倍时, $A_{492nm}=1.184$ 。对于竞争性ELISA筛选条件的选择,一般选取A值在1.0左右的条件较合适<sup>[6-8]</sup>。低浓度包被抗原有利于间接竞争性ELISA的目标分析物竞争,但包被浓度太低血清消耗量较大,相对误差也会增加。综合考虑,3 μg/ml和5 μg/ml包被效果基本相当,随后的ciELISA选取3 μg/ml为BMPA-OVA最适包被浓度,抗血清稀释度采用32000倍。

### 2.4 间接竞争ELISA

ciELISA标准曲线如图6。经过四参数拟合后,相关系数0.998, $IC_{50}=1.44 \mu\text{g/ml}$ ,检测限(按照90%结合率时的竞争抗原浓度计)为0.47 μg/ml。说明抗血清能够被丁草胺阻断,证明抗丁草胺抗体产生。同时,抗体的产生也从免疫效果的角度再次证明丁草人工抗原合成成功。

## 3 讨论

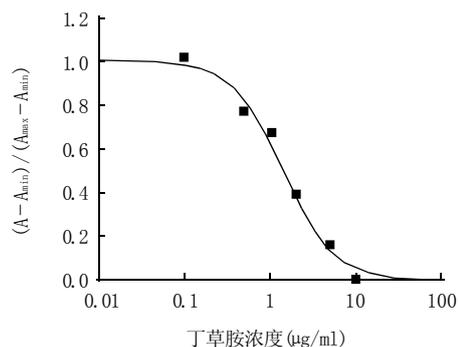


图6 ciELISA标准曲线  
Fig.6 Calibration curve of ciELISA

丁草胺分子上没有合适的活性基团,很难直接与蛋白偶联,因此必须将通过一段手臂结构进行连接,同时为了避免大分子载体蛋白对小分子半抗原的掩蔽效应,手臂结构还要有一定长度,以便半抗原更好暴露给免疫细胞识别。合成半抗原时还应尽可能保留待测物原有的大部分立体特征和电子特性,如果母化合物一个基团或原子需要被替换掉,替换来的原子或基团必须与被替换的原子或基团特征相似<sup>[5-7]</sup>。本研究中选择碳链较短的廉价3-MPA作为衍生剂,成功的获得了丁草胺抗血清。因此,作者认为硫换氯基本可保证丁草胺原有的立体特征和电性。

从丁草胺分子结构分析,除了从氯原子处衍生外,也可从N-乙氧丁基处衍生,但该处衍生后在侧链上少了一个强吸电子的氧原子,可能导致半抗原的电荷分布状态发生变化,与丁草胺的电性相似性降低,而且合成路线复杂,故本研究未采用。

## 4 结论

巯基丙酸与丁草胺连接生成半抗原,波谱鉴定表明半抗原合成成功;利用活泼脂法合成了丁草胺人工抗原,免疫原和包被抗原偶联比分别为11.2和8.9;免疫获得了丁草胺抗血清,棋盘滴定确定包被抗原工作浓度为3 μg/ml,抗血清稀释倍数为32000倍。建立了间接竞争ELISA标准曲线, $IC_{50}=1.44 \mu\text{g/ml}$ ,检测限为0.47 μg/ml。

在今后研究中应该进一步利用小鼠制备单克隆抗体,抗体纯化后可优化ELISA检测条件,开发丁草胺免疫分析试剂盒。

### 参考文献:

- [1] YU Y L, WU X M, LI S N, et al. Bioavailability of butachlor and meclobutanil residues in soil to earthworms[J]. Chemosphere, 2005, 59 (7): 961-967.
- [2] HILL A B, CHAUDHGI A M. Dialkylquinoneimine metabolites of chloroacetanilide herbicides induce sister chromatid exchange in cultured

# 水活度对牛肉中氧化品质的影响

陈丹, 朱东眉, 孙群\*

(四川大学生命科学学院, 四川 成都 610064)

**摘要:** 用含 15% 脂肪的牛肉为材料, 通过添加甘油 (0%、20%、40%、60%) 制备水活度范围为 0.84~0.98 的香肠, 分别在 25℃ 和 49℃ 储存 0、4、8 周时测定不同水活度香肠中脂质氧化、美拉德非酶促褐变、蛋白质氧化等氧化品质的变化。结果表明, 水活度从 0.98 降至 0.84 时对脂质氧化、蛋白质氧化及美拉德非酶促褐变三个氧化品质均无显著影响, 但该三个指标均受到加速贮藏 (49℃) 时间和温度的显著影响。因此, 中等水活度牛肉制品在加工和贮藏中除尽量降低水活度以抑制微生物生长的前提下, 应严格控制贮藏温度和时间从而延长货架期。

**关键词:** 水活度; 氧化品质; TBARS; 美拉德反应; 蛋白质氧化

Effects of Water Activity on Oxidative Quality in Intermediate Moisture Beef during Storage

CHEN Dan, ZHU Dong-mei, SUN Qun\*

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** Beef with 15% fat was added with glycerol (0%, 20%, 40%, 60%) to gain the intermediate moisture beef sausage with water activity ( $a_w$ ) from 0.98 to 0.84. The glycerol sausage was subjected to regular storage at 25℃ and accelerated condition at 49℃, and water activity, lipid oxidation, Maillard non-enzymatic browning reaction, protein oxidation were analyzed after 0, 4 and 8 week. The results showed that the accelerate storage temperature and time, but not water activity, had significantly effects on lipid oxidation, Maillard reaction and protein oxidation in intermediate moisture beef with  $a_w$  range of 0.84 to 0.98.

**Key words** water activity; oxidative quality; TBARS; Maillard reaction; protein oxidation

中图分类号: TS251.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0071-06

食品的氧化品质是影响食品感官指标和安全性的主要原因之一<sup>[1-2]</sup>。许多因素都可导致食品的氧化变质, 这些因素包括食品中脂质的不饱和程度、氧化反应催化剂、局部氧分压、外源或内源性添加物的浓度及水活

度 ( $a_w$ )<sup>[3]</sup>。

在鲜肉和完全干燥肉制品中, 水活度的变化范围不大, 因此不同水活度对肉品中化学反应的影响不需太多考虑。然而对含中等湿度的肉品 (半干肉) (intermediate

收稿日期 2007-08-05

\*通讯作者

作者简介: 陈丹 (1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物。

- human lymphocytes[J]. Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 1997, 395(2): 159-171.
- [3] XU D P, XU Z H, ZHU S Q, et al. Adsorption behavior of herbicide butachlor on typical soils in China and humic acids from the soil samples[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2005, 285(1): 27-32.
- [4] 杨永珍, 宋俊华, 吴厚斌, 等. 欧盟农药管理措施对我国的影响及对策[J]. 农药科学与管理, 2004, 25(4): 32-37.
- [5] GUO Y E, CHEN J H, WANG N D, et al. Preparation and application of polyclonal antibody to butachlor[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis, 2002, 38(4): 447-452.
- [6] MERCADER J V, MONTOYA A. A monoclonal antibody based ELISA for the analysis of azinphos-methyl in fruit juices[J]. 1997, 47(1): 95-101.
- [7] KIM Y J, CHO Y A, LEE H S, et al. Investigation of the effect of hapten heterology on immunoassay sensitivity and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the organophosphorus insecticide fenthion[J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 494(1): 29-40.
- [8] 余若祯, 施汉昌, 何苗, 等. 2,4-二氯苯氧乙酸完全抗原和抗体的制备[J]. 中国环境科学, 2005, 25(3): 288-292.
- [9] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 2004: 174-177.