

食品流通与包装

双酚 A 二环氧甘油醚的免疫检测方法研究

葛文亮¹, 林璐², 胥传来²

(1.无锡市第二人民医院, 江苏 无锡 214002; 2.江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: **目的** 快速检测湖水中的双酚 A 二环氧甘油醚。**方法** 试验设计一种新型双酚 A 二环氧甘油醚半抗原, 并成功与载体蛋白偶联, 经过小鼠免疫、细胞融合技术和三次亚克隆等方法, 成功筛选出了可以稳定分泌 BADGE 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。**结果** 成功制备了高灵敏度、高特异性的双酚 A 二环氧甘油醚单克隆抗体, 可以用于针对双酚 A 二环氧甘油醚的间接竞争酶联免疫吸附测定 (ic-ELISA)。基于单克隆抗体, 绘制了标准曲线, 结果显示, 单克隆抗体的 $IC_{50}=1.15\text{ ng/mL}$, 检测线性范围 $IC_{20}\sim IC_{80}$ 为 $0.16\sim 8.15\text{ ng/mL}$ 。通过加标回收实验, BADGE 在湖水的添加回收率均在 $80\%\sim 120\%$ 之间。**结论** 双酚 A 二环氧甘油醚单克隆抗体在实际湖水样品检测中的运用具有可行性。

关键词: 双酚 A 二环氧甘油醚; 单克隆抗体; ic-ELISA; 加标回收

中图分类号: TB487 文献标识码: A 文章编号: 1001-3563(2019)23-0059-05

DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2019.23.009

Immunoassay Method of 2,2-bis (4-glycidyloxyphenyl) Propane

GE Wen-liang¹, LIN Lu², XU Chuan-lai²

(1.Wuxi No.2 People's Hospital, Wuxi 214002, China;

2.School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT: The objective is to rapidly detect 2,2-bis (4-glycidyloxyphenyl) propane in lake water. A novel 2,2-bis (4-glycidyloxyphenyl) propane hapten was designed and successfully coupled with carrier protein. Hybridoma cell lines capable of stably secreting BADGE monoclonal antibody were successfully screened by the methods of mouse immunization, cell fusion technology and three subclones. A high sensitivity and specificity monoclonal antibody against 2,2-bis (4-glycidyloxyphenyl) propane, which can be used for indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) of 2,2-bis (4-glycidyloxyphenyl) propane was prepared successfully. Based on monoclonal antibody, the standard curve was drawn. The results showed that the IC_{50} of monoclonal antibody was 1.15 ng/mL , and the linear range of $IC_{20}\sim IC_{80}$ was $0.16\sim 8.15\text{ ng/mL}$. The recovery rate of BADGE in lakewater was between 80% and 120% . In conclusion, the application of 2,2-bis (4-glycidyloxyphenyl) propane monoclonal antibody in the detection of lake water is feasible.

KEY WORDS: 2,2-bis (4-glycidyloxyphenyl) propane; monoclonal antibody; ic-ELISA; standardized recovery

食品安全不仅仅是指食品本身的安全,食品接触材料的安全也是食品安全不可分割的重要组成部分。双酚 A 二环氧甘油醚 (BADGE) 是由环氧氯丙烷 (ECH) 与双酚 A (BPA) 缩聚合成的淡黄色液态环

氧化合物,是一种环境激素。近年常用于罐头食品等包装材料的内涂层,随着加工储藏过程迁移进入内容物中蓄积,污染食品,进而对人体健康造成威胁^[1]。世界卫生组织国际癌症研究机构公布的致癌物清单,

收稿日期: 2019-09-26

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFF0214803-04)

作者简介: 葛文亮 (1965—), 男, 主任技师, 主要研究方向为临床医学检验与免疫学。

双酚 A 二环氧甘油醚在 3 类致癌物清单中。

现今对 BADGE 分析检测方法主要采用高效液相色谱法^[2-4]、液质联用法^[5-7]、气质联用法^[8]等仪器方法。其中,李灿明等建立了高效液相色谱法测定金属涂层罐中 9 种双酚类环氧衍生物的迁移量,其中双酚 A-二缩水甘油醚 (BADGE) 及其衍生物分别在 30 ~ 10 000 $\mu\text{g/L}$ (水、乙酸 (3%)、乙醇 (10%)) 范围内与色谱峰面积呈良好的线性关系,相关系数均不低于 0.9950,检出限为 0.03 mg/L (BADGE 及其衍生物),测定结果的相对标准偏差不大于 7.39% ($n=6$),加标回收率为 80.32% ~ 113.86%。张海婧等建立了水中 8 种双酚-二环氧甘油醚的 SPE-HPLC-MS/MS 测定方法,结果表明,8 种双酚-二环氧甘油醚在 0.007~5.00 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.9990,该方法对 8 种双酚-二环氧甘油醚的定量限为 7~91 ng/L ,回收率为 79.1%~101%。现有的仪器检测法虽然有灵敏度高、适用范围广等优点,但是样品的前处理比较复杂,仪器成本高,检测时间比较长,仪器的操作也很繁琐,必须要专业人士才能进行实验,因此有必要研究一种特异性强、灵敏度高,同时价格低廉、快速简便的检测技术,而免疫分析方法就可以解决这些问题。

文中选择关注度比较高的双酚 A 二环氧甘油醚这种有害化合物作为研究对象,以制备针对该物质的单克隆抗体为技术基础,建立间接竞争酶联免疫检测方法 (ic-ELISA)。

1 实验

1.1 仪器与试剂

仪器:电子分析天平 (AB 104-N,梅特勒-托利多上海仪器有限公司);78 型磁力加热搅拌器,微型旋涡混合仪 (XW-80 A,金坛市盛蓝仪器制造有限公司);紫外分光光度计 (Agilent Cary 60 型,安捷伦科技有限公司);4 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻离心机 (赛默飞世尔科技有限公司);酶标仪 (MuLiskan Mk3,上海雷勃生物技术有限公司)。

试剂:双酚 A 二环氧甘油醚、双酚酸、弗氏佐剂,购自 Sigma 公司;N, N-二甲基甲酰胺 (DMF)

三正丁胺、氯甲酸异丁酯,均购自国药集团化学试剂有限公司;6-氨基己酸 (ACA)、碳化二亚胺 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS),均购自上海阿拉丁试剂公司;弗氏完全佐剂 (FCA)、弗氏不完全佐剂 (FIA)、匙孔血蓝蛋白 (KLH)、鸡卵清蛋白 (OVA),购自美国的 sigma 公司;0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲溶液 (CBS);0.01 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液 (PBS);含吐温-20 (体积分数为 0.05%) 的 0.01 mol/L 的 PBS (PBST)。

1.2 方法

1.2.1 半抗原的设计

BADGE 分子结构见图 1,其没有可以与载体蛋白偶联的活性基团,因此,参考 Richard A. Lawson 等^[9]的合成方法,由与 BADGE 结构类似的双酚酸出发,合成 BADGE 半抗原,合成路线见图 2。称取 500 mg (1.75 mmol) 双酚酸和 423 mg (3.5 mmol) 3-溴丙烯溶于 20 mL 湖水中,加入适量 KOH,保证在碱性条件下室温反应 0.5 h,再在 70 $^{\circ}\text{C}$,回流条件下,加热并搅拌反应 4 h,得到中间产物,然后将该中间产物进行双键环氧化反应,即可以得到有效半抗原 BBA。

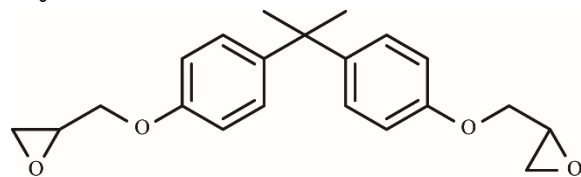


图 1 BADGE 的分子结构
Fig.1 Molecular structure of BADGE

1.2.2 BADGE 抗原和包被原的合成

采用混合酸酐法,具体方法见图 3。称取 BBA (4.48 mg),溶于 1 mL DMF,加入 4 μL 三正丁胺,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下搅拌 5 min 后,加入 2.23 μL 氯甲酸异丁酯,继续 4 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 0.5 h,得到活化液 A;取 30 mg KLH,溶于 6 mL 的 0.05 mol/L pH=9.6 的 CB 缓冲液,得到反应液 B;将 A 液逐滴加入反应液 B,此过程中冰浴,反应 5~6 h。然后,用 0.01 mol/L 的 pH=7.4 的 PBS 进行透析,得到抗原 BBA-MA-KLH。通过紫外分光光度法鉴定抗原是否成功偶联载体蛋白。

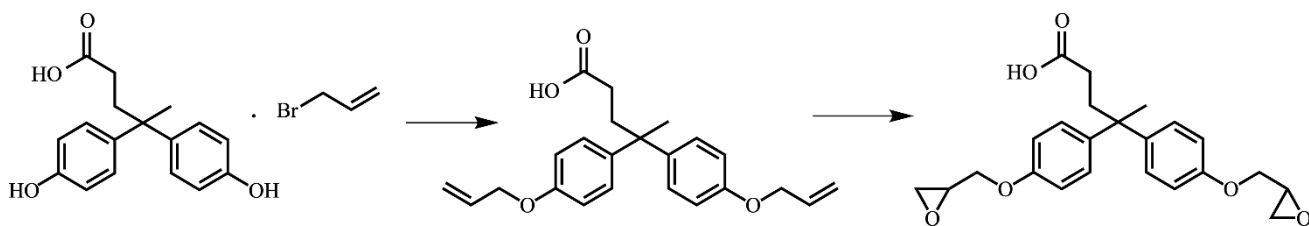


图 2 BBA 合成路线
Fig.2 Synthesis route of BBA

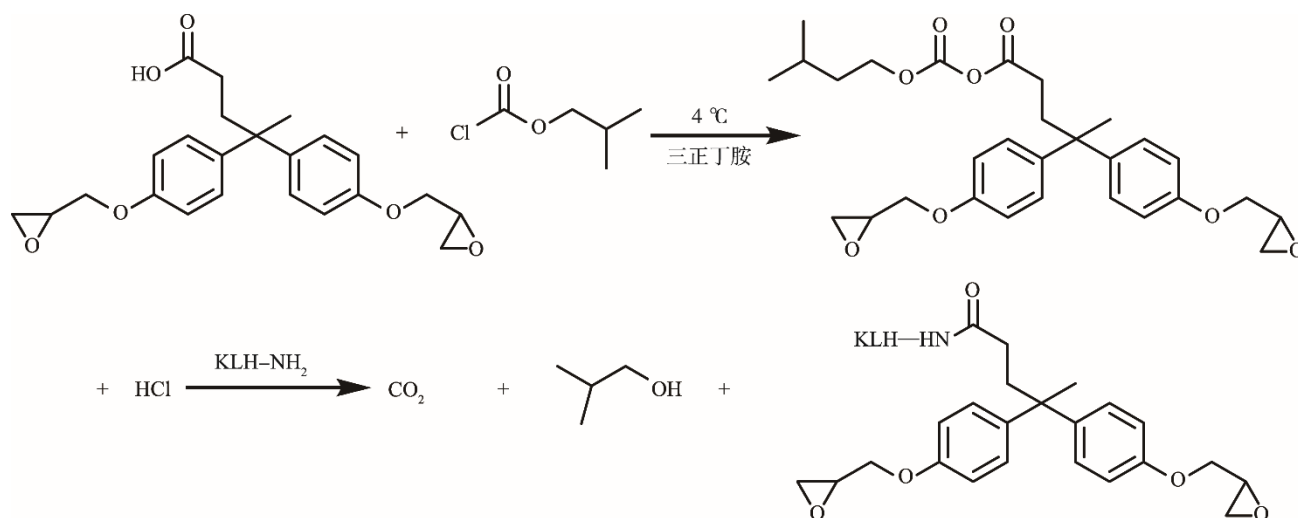


图 3 抗原和包被原合成路线

Fig.3 Synthesis route of antigen and coating antigen

1.2.3 动物免疫及杂交瘤细胞株的筛选

将 BBA-MA-KLH 作为抗原, 选取 6~8 周龄健康的 BALB/c 的雌性小鼠进行免疫, 免疫方式为颈背部皮下多点注射。首次免疫用完全弗氏佐剂与抗原混合, 之后都用不完全弗氏佐剂, 首次免疫后, 每次加强免疫与前一次间隔 3 周。第 3 次免疫后 7 d 采血 (小鼠断尾采血), 使用 ic-ELISA 法测定小鼠血清效价和抑制率, 选择效价高、抑制好的小鼠, 在最后一次免疫后 18~21 d 冲刺免疫, 腹腔注射, 要求冲刺免疫剂量减半且不含任何佐剂。

通过 PEG 法将小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行无菌融合, 经过 3 次亚克隆筛选出可以稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 具体操作步骤参考文献[10—11]。

1.2.4 腹水制备与单克隆抗体纯化

采用动物体内诱生法^[12—13]制备 BADGE 腹水。提前 1~2 周, 向 8 周龄的 BALB/c 小鼠腹腔注射无菌石蜡油 1 mL; 然后, 将收集好的杂交瘤细胞株腹腔注射到小鼠体内, 细胞个数约为每只 2×10^6 。观察小鼠腹部状态, 约 1 周后腹部明显肿大, 收集腹水, 离心, 弃上层油脂和沉淀, 取中间层清液。采用辛酸-饱和硫酸铵法纯化获得单克隆抗体。

1.2.5 最佳包被原浓度和抗体浓度确定

采用棋盘法^[14]3 倍倍比稀释包被原和单克隆抗体, 质量浓度依次为 1, 0.3, 0.1, 0.03 ng/mL。

1.2.6 间接竞争 ELISA 标准曲线绘制

将 BADGE 标准品用 DMF (10%) 的 0.01 mol/L PBS 缓冲液进行梯度稀释, 使质量浓度依次为 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0 ng/mL。在纵向 8 个孔的酶标板中依次加入稀释后的 8 个梯度, 50 μ L/孔。随

后, 加入最佳稀释倍数的抗体, 50 μ L/孔, 放入 37 °C 烘箱孵育 30 min; PBST 洗涤后加入 HRP 标记的羊抗鼠二抗, 37 °C 下孵育 30 min; PBST 洗涤后加入显色液, 37 °C 下孵育 15 min; 用 2 mol/L 硫酸溶液 (50 μ L/孔) 终止反应后, 酶标仪读出 450 nm 下的吸光度值。

1.2.7 交叉反应率的测定

为了评价抗体的特异性, 一般会选择结构类似物进行交叉反应的测定, 在最佳的反应条件测定类似物的 IC₅₀, 并与原药的 IC₅₀ 进行比较。计算交叉反应率 (CR) 的公式^[15]如下:

$$CR = \frac{IC_{50}(\text{原药})}{IC_{50}(\text{类似物})} \times 100\%$$

1.2.8 样品加标回收

选取湖水 (取自学校湖水, 经仪器分析鉴定为阴性) 为食品模拟物, 作为添加回收的样品。湖水的处理方案如下: 取 900 μ L 的湖水, 分别加入 100 μ L 的 2, 5, 10 ng/mL 的 BADGE 标准品溶液, 混匀后按照 ic-ELISA 的方法进行检测, 将样本稀释一定倍数使其在方法可检测的线性范围 (0.16~8.15 ng/mL) 内。

2 结果与讨论

2.1 抗原的鉴定

紫外表征见图 4, 从图 4 中可以看出双酚 A 二环氧甘油醚抗原合成成功: 其中半抗原 BBA 在 274 nm 和 281 nm 处有最大吸收峰, KLH 在 350 nm 和 280 nm 处有最大吸收峰; 偶联物 BBA-MA-KLH 在 350 nm 处有吸收峰, 在 280 nm 处的吸收峰出现叠加的峰型, 当偶联物中既有半抗原的吸收峰又有蛋白的吸收峰时, 说明偶联成功。

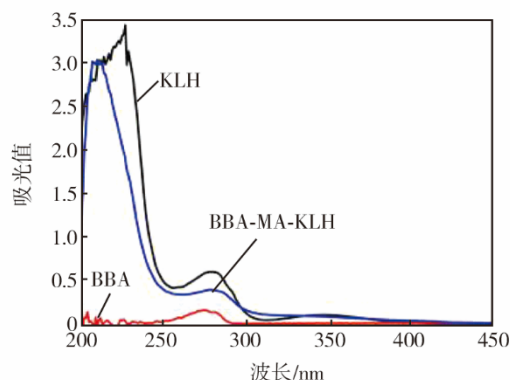


图4 抗原的紫外鉴定
Fig.4 UV-vis spectrum of immunogen

2.2 间接竞争 ELISA 标准曲线绘制

棋盘法确定抗原与抗体浓度,以 OD₄₅₀ 为 1.5 左右的组合为最佳工作点,由表 1 可知,最佳抗原抗体质量浓度均为 0.1 ng/mL。在最佳抗原浓度和抗体浓度条件下,绘制标准曲线,拟合标准曲线后得到 BADGE 抗体 IC₅₀ 为 1.15 ng/mL,线性范围 IC₂₀—IC₈₀ 为 0.16 ~ 8.15 ng/mL, BADGE 的标准抑制曲线见图 5。

表 1 单克隆抗体最佳工作点
Tab. 1 The workpoint of mAb

抗体/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	抗原/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			
	1	0.3	0.1	0.03
1	2.626	2.250	1.956	1.747
0.3	2.479	2.019	1.738	1.496
0.1	2.151	1.959	1.597	1.285
0.03	1.951	1.795	1.279	0.991

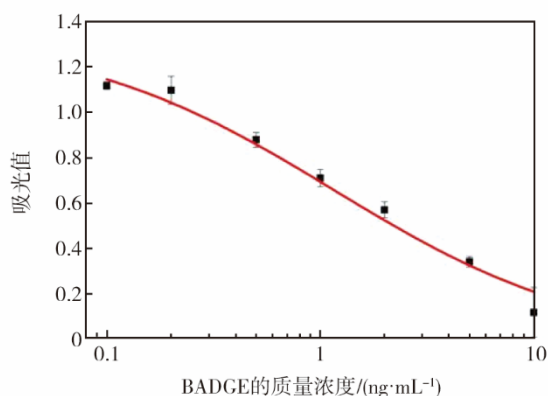


图5 BADGE 的标准抑制曲线
Fig.5 Standard inhibitive curve of BADGE

2.3 抗体交叉反应率测定

选择 BADGE 的衍生物来测定 BADGE 抗体的特异性。单抗的交叉反应率见表 2,由表 2 可知, BADGE

抗体与 BADGE·H₂O 有 11.5% 的交叉,与 BFDGE 及其他衍生物交叉率较低,均在 10% 以下,说明不存在交叉,因此抗体对 BADGE 具有较好的特异性,也能同时识别 BADGE·H₂O。

表 2 单抗的交叉反应率
Tab. 2 Cross reactivity results of mAb

化合物	IC ₅₀ /($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	交叉率/%
BADGE	1.15	100
BFDGE	500	0.2
BADGE·H ₂ O	10	11.5
BADGE·HCl	15	7.6
BADGE·H ₂ O·HCl	>500	<0.2
BADGE·2H ₂ O	>500	<0.2

2.4 样品加标回收分析

湖水中 BADGE 的添加回收结果见表 3,每个添加水平重复检测了 5 次。BADGE 在湖水中的添加回收率均在 80% ~ 120% 之间,说明了文中建立的 ic-ELISA 方法可以运用于湖水中 BADGE 的实际检测。

表 3 湖水样品的 BADGE 添加回收率
Tab.3 Fortified recovery for BADGE of lake water

添加水平/($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	平均回收率/%	变异系数/%
2	97.9	8.1
5	99.2	9.4
10	89.8	9.8

3 结语

成功制备了可以识别 BADGE 的单克隆抗体,制备出的单克隆抗体具有较高灵敏度 (IC₅₀=1.15 ng/mL) 高特异性,基于该抗体,建立了 ic-ELISA 检测方法可以准确定量地检测目标物 BADGE。此外,以湖水为实际样品的加标回收实验显示, BADGE 在湖水中的添加回收率均在 80% ~ 120% 之间,变异系数在 8.1%~9.8% 范围内,表明单克隆抗体在实际样品湖水中的运用具有可行性。

参考文献:

- [1] 郝倩, 苏荣欣, 齐巍, 等. 食品包装材料中有害物质迁移行为的研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(21): 279—286.
HAO Qian, SU Rong-xin, QI Wei, et al. Research Progress on Migration Behavior of Harmful Substances in Food Packaging Materials[J]. Food Science, 2014, 35(21): 279—286.

- [2] 龚强, 丁利, 肖家勇, 等. 石墨烯固相萃取-液相色谱-质谱联用法测定食品接触材料中 9 种双酚-二环氧甘油醚的迁移量[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(12): 1264—1271.
GONG Qiang, DING Li, XIAO Jia-yong, et al. Determination of 9 Kinds of Bisphenol Dioxglycerol Ethers in Food Contact Materials by Graphene Solid Phase Extraction Liquid Chromatography Mass Spectrometry[J]. Journal of Food and Biotechnology, 2014, 33(12): 1264—1271.
- [3] 曹晨, 李文斌, 宋青, 等. 采用固相萃取/高效液相色谱法测定保健食品中 12 种双酚类化合物的迁移量[J]. 首都公共卫生, 2017, 11(6): 267—271.
CAO Chen, LI Wen-bin, SONG Qing, et al. Determination of 12 Bisphenol Compounds in Health Food by SPE/HPLC[J]. Beijing Public Health, 2017, 11(6): 267—271.
- [4] 李灿明, 柏建国, 孙丽鹏, 等. 高效液相色谱法测定金属涂层罐中 9 种双酚类环氧衍生物的迁移量[J]. 化学分析计量, 2018, 27(5): 54—58.
LI Can-ming, BAI Jian-guo, SUN Li-peng, et al. Determination of the Migration of 9 Bisphenol Epoxy Derivatives in Metal Coated Cans by HPLC[J]. Chemical Analysis and Metrology, 2018, 27 (5): 54—58.
- [5] 张海婧, 林少彬. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱测定湖水中 8 种双酚-二环氧甘油醚[J]. 色谱, 2014, 32(7): 730—734.
ZHANG Hai-jing, LIN Shao-bin. Determination of 8 Bisphenol Dioxglycerol Ethers in Lake Water by Solid Phase Extraction High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry[J]. Chromatography, 2014, 32 (7): 730—734.
- [6] 陈波, 肖锋, 赵琼辉, 等. 液相色谱-串联质谱法测定乳制品中双酚 A 及其环氧衍生物[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(3): 584—588.
CHEN Bo, XIAO Feng, ZHAO Qiong-hui, et al. Determination of Bisphenol A and Its Epoxy Derivatives in Dairy Products by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry[J]. Chinese Journal of Health Inspection, 2013, 23(3): 584—588.
- [7] 赵晓亚, 付晓芳, 王鹏, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定肉类罐头中双酚-二缩湖水甘油醚[J]. 色谱, 2012, 30(10): 1002—1007.
ZHAO Xiao-ya, FU Xiao-fang, WANG Peng, et al. Simultaneous Determination of Bisphenol Diglyceride in Canned Meat by High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry[J]. Chromatography, 2012, 30(10): 1002—1007.
- [8] 焦艳娜, 丁利, 李晖, 等. 加速溶剂萃取-GC-MS/MS 法测定食品接触材料中双酚 A、双酚 F 及其衍生物的残留量[J]. 包装工程, 2011, 32(15): 53—57.
JIAO Yan-na, DING Li, LI Hui, et al. Determination of Bisphenol A, Bisphenol F and Their Derivatives in Food Contact Materials by Accelerated Solvent Extraction GC-MS/MS[J]. Packaging engineering, 2011, 32 (15): 53—57.
- [9] LAWSON R A, CHENG J, NOGA D E, et al. Aqueous and Solvent Developed Negative-tone Molecular Resists[J]. Proc Spie, 2010, 7639(6): 223—263.
- [10] 谢琨, 章先, 王歆, 等. 黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的制备及间接竞争 ELISA 检测技术研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(10): 2033—2040.
XIE Hun, ZHANG Xian, WANG Xin, et al. Preparation of Monoclonal Antibody Against Aflatoxin B1 and Study on Indirect Competitive ELISA[J]. Microbiological Bulletin, 2015, 42 (10): 2033—2040.
- [11] 刘琦, 生威, 李志, 等. 基于单克隆抗体的玉米赤霉烯酮检测方法研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(21): 111—115.
LIU Qi, SHENG Wei, LI Zhi, et al. Study on the Detection Method of Zearalenone Based on Monoclonal Antibody[J]. Food Research and Development, 2017, 38 (21): 111—115.
- [12] 李春生, 刘静静, 杜顺丰, 等. 呋喃唑酮代谢物单克隆抗体和胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 现代食品科技, 2017, 33(6): 326—331.
LI Chun-sheng, LIU Jing-jing, DU Shun-feng, et al. Development of Monoclonal Antibody and Colloidal Gold Immunochromatographic Strip for Furazolidone Metabolites[J]. Modern Food Technology, 2017, 33(6): 326—331.
- [13] 杨小康, 张绘艳, 顾建红, 等. 拉沙里菌素单克隆抗体的研制及间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(10): 3049—3056.
YANG Xiao-kang, ZHANG Hui-yan, GU Jian-hong, et al. Development of Monoclonal Antibody Against Lasamycin and Establishment of Indirect Competitive ELISA[J]. China animal Husbandry and Veterinary, 2017, 44(10): 3049—3056.
- [14] 白宇, 胡景炎, 许永鹏, 等. 雌二醇单克隆抗体制备及间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(10): 3100—3105.
BAI Yu, HU Jing-yan, XU Yong-peng, et al. Preparation of Monoclonal Antibody Against Estradiol and Establishment of Indirect Competitive ELISA[J]. China Animal Husbandry and Veterinary, 2017, 44(10): 3100—3105.
- [15] 陈荫楠, 陈华, 石贤爱, 等. 抗呋喃唑酮单克隆抗体的制备及其应用[J]. 食品科学, 2016, 37(3): 157—163.
CHEN Yin-nan, CHEN Hua, SHI Xian-ai, et al. Preparation and Application of Monoclonal Antibody Against Furazolidone[J]. Food Science, 2016, 37(3): 157—163.