

酶联免疫吸附分析法测定苯并(a)芘和多氯联苯

邓安平

(四川大学化学学院, 成都, 610064)

摘 要 对苯并(a)芘作了五种不同的化学修饰, 并与载体蛋白交联, 制备出十四种单克隆抗体. 经单克隆抗体的筛选和实验条件的优化, 建立了测定苯并(a)芘的酶联免疫吸附分析法. 以 4,4'-二氯联苯为测定多氯联苯的酶联免疫吸附分析法的起始物, 作了二种化学修饰, 制备出九种多克隆抗体, 建立了以羊抗多氯联苯抗体为基础的酶联免疫吸附分析法, 并用于土壤中多氯联苯的测定.

关键词 酶联免疫吸附分析法, 苯并(a)芘, 多氯联苯.

多环芳烃(PAHs)和多氯联苯(PCBs)是两类影响较大的环境污染物. 多环芳烃中又以苯并(a)芘(BaP)的毒性最强. 测定苯并(a)芘和多氯联苯的方法主要是色谱分析法, 但是色谱法仪器昂贵、样品预处理复杂、费时^[1-4]. 酶联免疫吸附分析法(ELISA)具有灵敏度高、特异性强的特点. 测定环境中苯并(a)芘和多氯联苯的 ELISA 均已有报道^[5-6].

本文报道了测定苯并(a)芘和多氯联苯的酶联免疫吸附分析法. 以单克隆抗体为基础, 测定水中的苯并(a)芘, 并以羊抗多氯联苯抗体为基础, 用于土壤中多氯联苯的测定.

1 苯并(a)芘和多氯联苯的修饰

在苯并(a)芘的 6 位, 7 位和 10 位作了五种不同的修饰, 使其末端带有活性基团羧基, 其中 7 位和 10 位上修饰基团链长为四个碳, 而 6 位的修饰基团链长分别为三、四、五个碳, 如图 1 所示. 多氯联苯以 4,4'-二氯联苯为代表, 作了两种修饰, 一种形成重氮化合物后立即与蛋白交联, 另一种修饰成带有羧基的碳链, 如图 2 所示.

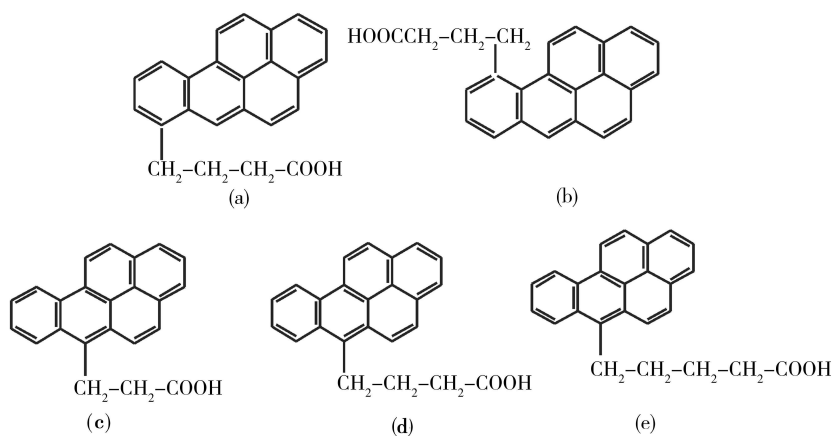


图 1 末端带有羧基活性基团的五种苯并(a)芘修饰物的结构

(a), (b) 分别为 7 位和 10 位上的修饰基团, 链长为四个碳的修饰物;
(c), (d), (e) 为 6 位上的修饰基团, 链长分别为三、四、五个碳的修饰物

Fig 1 Structure of five different modified benzo(a)pyrene derivatives

将带羧基的苯并(a)芘和多氯联苯的修饰物在二甲基甲酰胺(DMF)中与双二环己基碳化二亚胺盐酸盐(DCC)和 N-羟基琥珀酸亚胺(NHS)在室温下反应过夜, 离心, 取上清液加入到 pH 约为 8 的蛋白质(载体蛋白为牛血清白蛋白和钥孔虫戚血蓝素)溶液中, 室温反应 3—4h, 反应液装入透析袋, 于 4℃冰箱中在磷酸盐缓冲溶液中透析 3—4d, 冷冻干燥, 低温保存.

苯并(a)芘-蛋白质偶合物用作免疫原对 BALB/c小鼠进行免疫, 接受免疫的小鼠的脾细胞与肿瘤细胞融合, 融合细胞在培养液中培养, 用间接 ELISA 对培养液中的抗体进行筛选和质量鉴定. 共筛选出 14种与 BaP 有特异性反应的单克隆抗体. 4,4'-二氯联苯-蛋白质偶合物对八只兔子和一只羊进行免疫, 得到九种多克隆抗体.

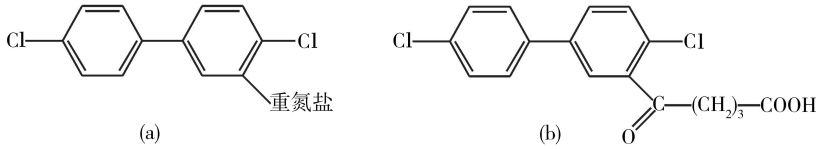


图 2 4,4'-二氯联苯修饰物的结构

(a) 重氮盐修饰物, (b) 末端带有羧基且修饰基团链长为四个碳的修饰物

Fig 2 Structure of modified 4,4'-dichlorobiphenyl derivative

2 酶联免疫分析法

苯并(a)芘和多氯联苯分别用间接和直接竞争 ELISA 测定. 间接法是用包被抗原包板, 而直接法用抗体包板. 最后用酶标仪测定各孔溶液的吸光度(A). 待测物浓度愈大, 吸光度愈小. 以 $A - \lg C$ 或 $B/B_0 \times 100\% - \lg C$ 作图 (B_0 和 B 分别为浓度为零和其它标准液时的吸光度). 计算检出限(DL)和 IC_{50} (信号降低一半所对应的浓度). IC_{50} 值越愈小, 灵敏度愈高.

3 灵敏度

苯并(a)芘的测定: 从十四种单克隆抗体中, 筛选出灵敏度最高的单抗(编号为 22F12). 标准曲线如图 3所示, $DL = 0.02 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, $IC_{50} = 0.21 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$.

多氯联苯的测定: 羊抗血清与 PCBs的亲合力较大. 以 Arochol 1242(主要含 4,4'-二氯联苯)为标准溶液, 标准曲线如图 4所示, $DL = 8.9 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, $IC_{50} = 205 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$.

测定苯并(a)芘的方法的比测定多氯联苯的方法大约灵敏 1000倍.

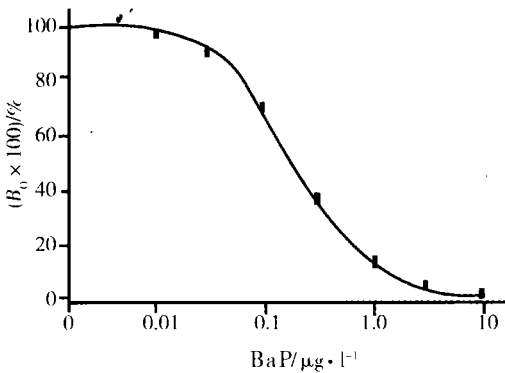


图 3 ELISA 测定苯并(a)芘的标准曲线

Fig. 3 Standard curve for benzo(a)pyrene determination by ELISA

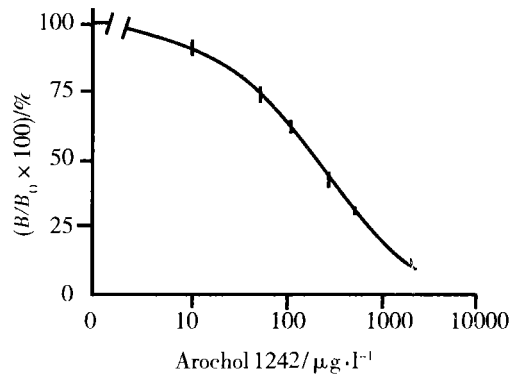


图 4 ELISA 测定 4,4'-二氯联苯的标准曲线

Fig. 4 Standard curve for 4,4'-dichlorobiphenyl determination by ELISA

4 特异性

单抗 22F12与蒽、芘并(1,2,3-ed)芘和苯并(b)荧蒽的交叉反应率超过 20%, 主要是这三种 PAHs 的结构与 BaP 非常相似, 但 22F12与含 2-3个苯环的 PAHs 的交叉反应率均小于 1%, 表明单抗 22F12的特异性比较高.

羊抗血清与 Arochol 1248, Arochol 1254 和 Arochol 1260的交叉反应率分别为 79.6%, 31.7% 和 13.6%, 与其它 PCBs的交叉反应率均比较小.

5 环境样品的测定

水样中苯并(a)芘的测定: 取自来水、湖水和河水, 加入苯并(a)芘标准溶液, 配成浓度为 0.1、0.3和 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 的加标试样, 以单克隆抗体为基础, 用酶联免疫吸附分析法测定苯并(a)芘的含量。如表 1所示, 自来水、湖水和河水的平均回收率分别为 104.6%, 131.4%和 146.7%。湖水和河水中的回收率较高, 可能源于基质效应的影响, 也可能是湖水和河水中存在极微量的苯并(a)芘所致。

土样中多氯联苯的测定: 空白土样中多氯联苯的加标含量范围为 4—64 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。用酶联免疫吸附分析法测定加标土样的多氯联苯含量。批间测定的变异系数在加标值最小(4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)时较高, 为 25.2%, 在其它加标值(8—64 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)时均小于 20%, 回收率为 90.58%—106.99%, 结果如表 2所示。用所建立的酶联免疫吸附分析法测定八个受 PCBs污染的土壤样品, 测定值在 26.5—2090 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 之间。

表 1 ELISA 测定苯并(a)芘加标水样的回收率

Table 1 Recoveries of ELISA for the determination of benzo(a) pyrene in spiked water samples

加标浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	自来水	湖水	河水
0.1	98.9	160	162
0.3	112	135.7	146.7
1.0	103	98.4	99.3
平均回收率 \pm 标准偏差/%	104.6 \pm 6.7	131.4 \pm 31	146.7 \pm 44.7
变异系数/%(n=3)	6.4	23.6	30.5

表 2 ELISA 测定多氯联苯加标土壤样品

Table 2 The results of ELISA for the determination of polychlorobiphenyl in spiked soil samples

加标含量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	0	4	8	16	32	64
测定值/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.87	5.12	9.43	16.57	29.86	58.93
标准偏差	± 0.76	± 1.29	± 1.37	± 2.46	± 4.20	± 7.76
批间变异系数/%		25.20	14.74	14.84	14.38	13.16
回收率/%		106.05	106.99	98.12	90.58	90.88

用气相色谱重新测定这八个土壤样品, 两种方法的测定值非常接近, 拟合曲线斜率为 0.7913 线性相关系数为 0.9866 如图 5所示。

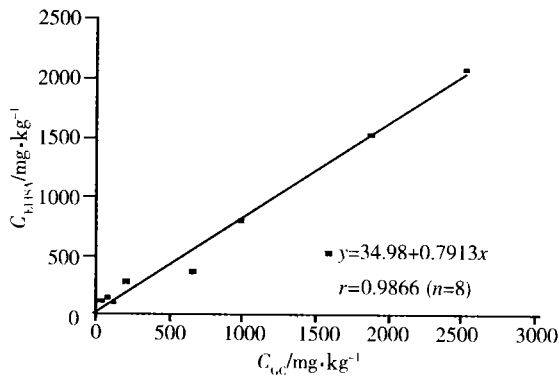


图 5 酶联免疫吸附分析法和气相色谱法测定土壤样品中多氯联苯含量的相关性曲线

Fig 5 Correlation of ELISA and GC for the determination of polychlorobiphenyl in soil samples

综上所述, 本研究对苯并(a)芘作了五种不同的化学修饰, 并与载体蛋白交联, 制备出了十四种单克隆抗体。经单克隆抗体的筛选和实验条件的优化, 建立了灵敏度高和选择性好的测定苯并(a)芘的酶联免疫吸附分析法。以 4,4'-二氯联苯为起始物, 作了二种化学修饰, 制备出九种多克隆抗体, 建立了基于多克隆抗体的测定多氯联苯的酶联免疫吸附分析法, 并用于土壤中多氯联苯的测定。

参 考 文 献

- [1] Martinez-Lopez S, Morales-Noe A, Pastor-Garcia A. Sample Preparation Improvement in Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Determination in Olive Oils by Gel Permeation Chromatography and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. AOAC International*, 2005, 88(4): 1247-1254.
- [2] Al-Haddad A. A Selective Method for the Determination of Benzo[a]Pyrene in Soil Using Porous Graphitic Carbon Liquid Chromatography

Columns *Talanta*, 2003, **59** (4) : 845—848

- [3] Yague C, Bayari S, Conchello P et al, Determination of Pesticides and PCBs in Virgin Olive Oil by Multicolumn Solid-Phase Extraction Cleanup Followed by GC-NPD/ECD and Confirmation by Ion-Trap GC-MS. *J. Agricultural & Food Chemistry*, 2005, **53** (13) : 5105—5109
- [4] 汤桦, 陈大舟, 邵明武等. 加速溶剂萃取-气相色谱-质谱法分析土壤中多氯联苯. *质谱学报*, 2004, **25** (B10) : 85—86
- [5] Troisi G M, Borjesson L, Development of an Immunoassay for the Determination of Polyaromatic Hydrocarbons in Plasma Samples from Oiled Seabirds. *Environmental Science & Technology*, 2005, **39** (10) : 3748—3755
- [6] Centi S, Laschi S, Franek M, A Disposable Immunomagnetic Electrochemical Sensor Based on Functionalised Magnetic Beads and Carbon-Based Screen-Printed Electrodes (SPCEs) for the Detection of Polychlorinated Biphenyls (PCBs). *Analytica Chimica Acta*, 2005, **538** (1—2) : 205—212

ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR THE ANALYSIS OF BENZO (a) PYRENE AND POLYCHLOROBIPHENYL

DENG An-ping

(College of Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

ABSTRACT

Five different modifications were made for benzo(a) pyrene. The modified benzo(a) pyrenes were coupled to carrier proteins and the prepared conjugates of benzo(a) pyrene-proteins were used as immunogens for the production of antibodies. Fourteen monoclonal antibodies (mAb) were obtained and screened. The superior one was selected and used for the establishment of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the analysis of benzo(a) pyrene in water samples. To develop an ELISA for polychlorobiphenyls (PCBs), 4,4'-dichlorobiphenyl was used as a representative compound and was modified in two ways. Nine polyclonal antibodies (pAb) were obtained. Based on the utilization of goat pAb, the ELISA for PCBs was developed and successfully applied for the determination of PCBs in soil samples.

Keywords enzyme linked immunosorbent assay, benzo(a) pyrene, polychlorobiphenyl