

双酚 A 人工抗原的光谱表征及免疫鉴定研究

郑 劼, 张 焜, 赵肃清*

广东工业大学轻工化工学院, 广东 广州 510006

摘 要 双酚 A (bisphenol A, BPA) 是一种酚类环境雌激素, 即使极低剂量残留对人类健康也有危害。为了建立其简单快速并适应现场检测的免疫分析方法, 必须先合成它的人工抗原并进行鉴定。通过对双酚 A 进行结构修饰, 用碳二亚胺将结构修饰了的双酚 A 与牛血清蛋白相偶联, 经透析得到纯的双酚 A 人工抗原并冷冻干燥备用。然后用紫外光谱、红外光谱和免疫方法对人工抗原进行鉴定。结果表明, 合成的人工抗原紫外光谱图中具有蛋白质和双酚 A 的特征吸收峰; 人工抗原红外光谱图中呈现双酚 A 和牛血清蛋白的红外特征吸收峰; 通过竞争 ELISA 试验表明用合成的人工抗原免疫的 Balb/c 小鼠血清中产生了双酚 A 的抗体。三种方法综合鉴定结果表明双酚 A 人工抗原合成成功, 该人工抗原可以进一步用于制备抗双酚 A 的单克隆抗体。

关键词 双酚 A; 人工抗原; 光谱; 免疫; 鉴定

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2008)07-1583-04

引 言

双酚 A (bisphenol A, BPA) 是一种酚类环境雌激素^[1, 2], 又名 2, 2-双(4-羟基苯基)丙烷、二苯酚基丙烷。双酚 A 是重要的精细化工原料, 是生产聚碳酸酯、环氧树脂、聚砜以及改性酚醛树脂等的重要中间体。

双酚 A 可通过食品包装容器和塑料薄膜渗入食品或饮料进入体内, 用于牙科的树脂和牙齿密封剂由 BPA 或 BPA-双甲基丙烯酸酯组成, 能从牙体缓慢渗入唾液而进入体内。双酚 A 还能诱导人类乳腺癌、前列腺癌的发生^[3, 4]。BPA 也可以使雄鱼体内的卵黄蛋白原 vitellogenin (VTG) 浓度显著提高, 抑制睾丸的生长及受精卵的发育^[5]。目前, 国内外检测 BPA 的方法有紫外分光光度法、双波长分光光度法、气相色谱 (GC) 法、气相色谱-质谱 (GC/MS) 法、高效液相色谱 (HPLC) 法、高效液相色谱-紫外法 (HPLC/UV)、液相色谱-质谱 (LC/MS) 法、反相液相色谱法、极谱法、荧光法、分子印记及 ELISA 法等^[6-18]。仪器方法检出限可达到 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 但样品前处理繁琐, 操作耗时, 也不适应现场测定。因此, 建立简便、快速、准确并适应现场测定的免疫分析方法对检测双酚 A 残留具有重要的意义。王兰^[16]等对双酚 A 人工抗原合成进行了研究, 但鉴定方法过于简单。本研究用光谱和免疫方法对合成的双酚 A 人工抗原进行综合鉴定, 期望为进

一步建立双酚 A 免疫分析方法提供基础, 也为其他小分子化合物的人工抗原合成与光谱鉴定提供参考。

1 实验方法

1.1 材料与仪器

双酚 A (C.P., 上海化学试剂公司), 牛血清蛋白 (BSA, 上海伯奥生物科技有限公司), N-羟基丁二酰亚胺 (NHS, 国药集团试剂公司), 碳二亚胺盐酸盐 (EDC · HCl, Sigma 公司), 羊抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶 (武汉博士德生物工程有限公司), 氯代乙酸、无水氯化铝、N,N'-二甲基甲酰胺 (DMF)、邻苯二胺 (OPD)、Tween-20、双氧水、均为市售分析纯产品。pH 7.0 磷酸缓冲溶液 (PBS), pH 9.0 碳酸盐缓冲溶液 (CBS), pH 5.0 磷酸柠檬酸缓冲溶液。

Nicolet 380 红外光谱仪 (美国热电公司), TU-1901 紫外-可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司), Bio-Rad 680 型酶标仪 (美国伯乐公司)。

1.2 人工抗原的合成与鉴定

1.2.1 人工抗原的合成

将 1.370 4 g 双酚 A 和 0.670 2 g 无水氯化铝投入到三口烧瓶中, 称取 0.470 5 g 氯乙酸溶于 8 mL DMF 中, 缓慢滴入三口烧瓶, 低温下搅拌至反应趋于缓和, 逐渐升高温度, 反应至不再生成气体为止, 冷却, 过滤, 称取 0.057 5 g

收稿日期: 2007-05-10, 修订日期: 2007-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20672023) 和广东省自然科学基金项目 (05001814, 06012298) 资助

作者简介: 郑 劼, 1984 年生, 广东工业大学在读硕士研究生 *通讯联系人 e-mail: suqingzhao@yahoo.com.cn

NHS 和 0.0958 g EDC·HCl 溶于 2 mL DMF 中,与滤液混合搅拌反应 2 h,另称取 0.1002 g BSA 溶于 3 mL pH 7.0 磷酸缓冲溶液中,并将上述反应液缓慢滴加其中,4 °C 下反应 2 h,离心分离 10 min,上清液转移到透析袋,用 pH 7.0 磷酸缓冲溶液和蒸馏水各透析 36 h,每 12 h 换一次透析液,最后将透析液经冷冻干燥得到双酚 A 人工抗原。

1.2.2 人工抗原的紫外光谱鉴定

将双酚 A、牛血清蛋白、双酚 A 人工抗原分别进行紫外光谱扫描。

1.2.3 人工抗原的红外光谱鉴定

将双酚 A 人工抗原和牛血清蛋白用 KBr 压片后进行红外光谱扫描。

1.2.4 人工抗原的间接竞争 ELISA 鉴定

用双酚 A 人工抗原免疫 Balb/c 小鼠 3 次后,尾部取血,制备血清,以间接竞争 ELISA 法测定标准浓度双酚 A 对免疫小鼠血清的抗体抑制。方法如下:①用包被液碳酸盐缓冲溶液将抗原稀释为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,并以 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到酶标条中,用封膜覆盖 96 孔酶标板,37 °C 温箱温育 1 h,4 °C 过夜。电干孔中的液体,用 PBST(PBS+0.5% Tween20)洗涤一次,吸水纸拍干;② $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脱脂奶粉加入孔中,37 °C 封闭 1 h,电干孔中液体,用 PBST 洗涤三次,每次 5 min,吸水纸拍干;③加入 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$ 不同浓度($100, 10, 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $100, 10, 1, 0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)的双酚 A 标准溶液加入酶标板中,再加入 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$ 一定浓度的抗血清稀释液,每条酶标板最后留一孔作为空白对照,37 °C 温育 1 h, PBST 洗板三次,吸水纸拍干;④加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$,37 °C 温育 1 h, PBST 洗板三次,吸水纸拍干;⑤加入新鲜配置的底物液(磷酸柠檬酸缓冲液稀释液的 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ OPD, $1 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ H_2O_2) $100 \mu\text{L}/\text{孔}$,37 °C 温育 0.5 h,加入终止液 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓硫酸 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$;⑥肉眼观察每孔颜色变化,并用酶标仪测定波长 492 nm 处的 OD 值。

2 结果与讨论

2.1 人工抗原的鉴定

2.1.1 紫外光谱表征

从图 1 可以看出 BSA 在 278 nm 处有特征吸收峰,双酚 A 人工抗原在 278 nm 处也出现了特征吸收峰,并保留了 226 nm 处的双酚 A 的特征吸收峰,这说明合成的双酚 A 人工抗原兼具了载体蛋白质和双酚 A 的特征峰,间接说明了双酚 A 人工抗原合成成功^[19]。

2.1.2 红外光谱表征

图 2 为牛血清蛋白 BSA 和双酚 A 人工抗原的红外谱图。BSA 的红外光谱呈现了蛋白质类共有的吸收,如 3306 cm^{-1} 的氨基 N—H 吸收峰、 1653 cm^{-1} 的酰胺谱带 I 和 1536 cm^{-1} 的酰胺谱带 II 等^[20]。将双酚 A 人工抗原和 BSA 的红外光谱对比可知:(1)双酚 A 人工抗原在 $2500 \sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ 和 $1300 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ 出现了与 BSA 相类似的吸收峰,这是 BSA 中氨基酸的特征峰,说明合成的双酚 A 人工抗原中含

有 BSA;(2)双酚 A 人工抗原出现了 BPA 在 3400 cm^{-1} 的羟基特征吸收峰,并且在 $1000 \sim 1300 \text{ cm}^{-1}$ 出现了 BPA 与 BSA 偶联后的 C—N 伸缩振动吸收峰,而 BSA 的 IR 中并无此吸收峰,进一步说明双酚 A 人工抗原合成成功。

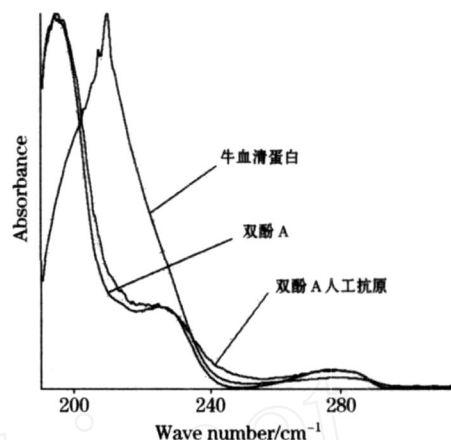


Fig. 1 UV spectrum of BSA bisphenol A and artificial antigen of bisphenol A

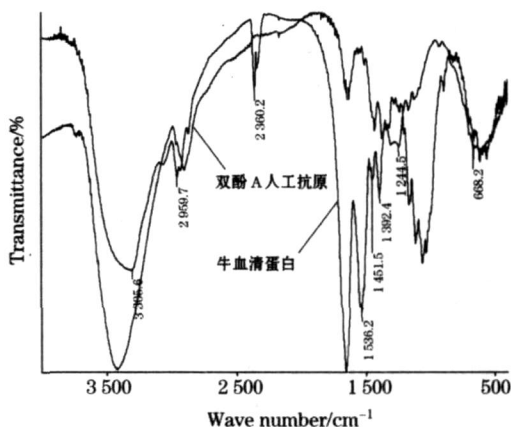


Fig. 2 IR spectrum of BSA and artificial antigen of bisphenol A

2.1.3 人工抗原的间接竞争 ELISA 鉴定

间接竞争 ELISA 法测得双酚 A 标准溶液相对应的 OD_{492} 值见表 1。在等量包被的双酚 A 人工抗原酶标板中,加入等量的抗血清后,随着加入的双酚 A 越多,显色越弱。这

Table 1 OD_{492} of indirect competitive ELISA with standard solution of bisphenol A

Bisphenol A standard solution($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	OD_{492}
1×10^5	0.433
1×10^4	0.494
1×10^3	0.550
100	0.616
10	0.652
1	0.728
0.1	0.861
0	0.983

说明加入的双酚 A 越多,双酚 A 与血清中适量的抗双酚 A

抗体结合越多,从而血清中双酚 A 抗体与包被的双酚 A 人工抗原结合就减少,引起发色反应减弱,OD 值降低。因此,通过间接竞争 ELISA 显色反应,直接证明合成的人工抗原免疫 Balb/c 小鼠后产生了抗双酚 A 的抗体,更进一步证明双酚 A 人工抗原合成成功。

蛋白质偶联并纯化后得到的双酚 A 人工抗原,经紫外光谱、红外光谱和免疫方法综合鉴定,表明双酚 A 人工抗原成功合成,可以进一步用于制备抗双酚 A 的单克隆抗体和建立合适的双酚 A 免疫分析方法。

3 结 论

对双酚 A 进行结构修饰后,用碳二亚胺法使之与牛血清

参 考 文 献

- [1] Shane A Snyder, Daniel L Villeneuve, Erin M Snyder, et al. Environmental Science & Technology, 2001, 35(18): 3620.
- [2] Sajiki J, Miyamoto F, Fukata H, et al. Food Addit. Contam., 2007, 24(1): 103.
- [3] Kang J H, Kondo F, Katayama Y. Toxicology, 2006, 226(2-3): 79.
- [4] Julian Josephson. Environ. Health Perspectives, 2006, 114(9): A520.
- [5] Sohoni P, Tyler C R, Hurd K, et al. Environmental Science and Technology, 2001, 35(14): 2917.
- [6] Gregory V Korshin, Jaeshin Kim, Lili Gan. Water Research, 2006, 40(5): 1070.
- [7] Koichi Inoue, Megumi Wada, Tae Higuchi, et al. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science, 2002, 773(2): 97.
- [8] ZHANG Wen-de, MA Zhi-dong, GUO Zhong(张文德,马志东,郭忠). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2003, 31(2): 249.
- [9] ZHUNG Hui-sheng, LI Jiu-hua, WANG Qiong-e(庄惠生,李金花,王琼娥). Environmental Monitoring in China(中国环境监测), 2004, 20(4): 15.
- [10] XU Zhi-feng, LIU Lan, DENG Qin-ying(许志锋,刘岚,邓芹英). Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni(中山大学学报·自然科学版), 2005, 44(3): 53.
- [11] Gerardo R Marchesini, Eline Meulenber, Willem Haasnoot, et al. Analytica Chimica Acta, 2005, 528: 37.
- [12] WEI Kong-ji, ZHAO Mei-ping, LI Yuan-zong, et al(魏孔吉,赵美萍,李元宗,等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2005, 33(8): 1122.
- [13] Braunrath R, Podlipna D, Padlesak S, et al. J. Agricultural Food Chemistry, 2005, 53(23): 8911.
- [14] Li D, Park J, Oh J R. Anal. Chem., 2001, 73(13): 3089.
- [15] Watabe Y, Hosoya K, Tanaka N, et al. Anal. Bioanal Chem., 2005, 381(6): 1193.
- [16] WANG Lan, YU Yuyan, WANG Qiong-e, et al(王兰,余宇燕,王琼娥,等). Chemical Reagents(化学试剂), 2005, 27(12): 713, 725.
- [17] XIAO Quan-wei, LI Yuan-qian, WU De-sheng(肖全伟,黎源倩,吴德生). Chinese Journal of Chromatography(色谱), 2004, 22(6): 579.
- [18] DENG Lin, ZHANG Wei-hao, FENG Xiang-hua, et al(邓琳,张维昊,封享华,等). Journal of Analytical Science(分析科学学报), 2004, 20(5): 461.
- [19] ZHAO Su-qing, CAI Yan-fei, LEI Hong-tao, et al(赵肃清,蔡燕飞,雷红涛,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(2): 207.
- [20] CHEN Kui-zhi, PENG Yi-ru, LIN Wei, et al(陈奎治,彭亦如,林伟,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(1): 84.

Study on Spectral and Immune Identification of Artificial Antigen of Bisphenol A

ZHENG Jie, ZHANG Kun, ZHAO Su-qing *

Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China

Abstract Bisphenol A (BPA) is able to mimic the effects of endogenous hormones and it influences the central nervous system in human being. In recent years, BPA has largely arisen because it is released into our environment from many kinds of the polycarbonate plastics and epoxy resins of food cans. Because trace residual amount of BPA might be harmful to human being, many instrument analysis methods have been developed for the determination of BPA. But these instrument analysis methods require complicated pre-treatment steps and do not suit rapid processing of multiple samples. Gold-labeled immunochromatography assay method can provide *in situ* monitoring of trace BPA in ground-water and drinking water. In order to build the simple and fast gold-labeled immunochromatography assay method, it is necessary to synthesize and identify artificial antigen of BPA firstly. The modified BPA was conjugated with the carrier of bovine serum albumin (BSA) by EDC · HCl, after dialyzed, the synthesized artificial antigen of BPA was lyophilized, and then stored at -20 °C. Three methods such as UV and IR spectra scanning and immunoassay were used to determine whether artificial antigen of BPA had been synthesized. The results showed that UV spectrum of artificial antigen of BPA has one absorbance band at 278 nanometers (nm) which is the characteristic absorbance band of the carrier of bovine serum albumin, and another absorbance band at 226 nm which is the characteristic absorbance band of BPA. The IR spectrum absorbance bands of bovine serum albumin and BPA appeared on the IR spectrum graph of artificial antigen of BPA, moreover, shrinked vibration bands at 1 000-1 300 cm^{-1} showed that a C—N bond was produced and suggested that the modified BPA and BSA had been linked. The antibody of anti-BPA was raised in sera of immunized Balb/c mice by indirect competitive ELISA. So the above results showed that the artificial antigen of BPA was synthesized successfully. The artificial antigen of BPA can be used to develop monoclonal antibody of anti-BPA and also to prepare gold-labeled immunochromatography assay method for *in situ* monitoring of BPA in the future.

Keywords Bisphenol A; Artificial antigen; Spectrum; Immunity; Identification

(Received May 10, 2007; accepted Aug. 20, 2007)

* Corresponding author