

食品模拟物中双酚 A 迁移量的间接竞争免疫 PCR 检测方法

龚强¹, 丁利¹, 肖家勇¹, 徐丽广², 罗斯斯³,
焦艳娜¹, 朱绍华¹, 文江为¹, 付善良¹, 王利兵^{*1}

(1. 湖南出入境检验检疫局技术中心, 食品安全科学技术湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410004; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 3. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

摘要: 通过抗原-抗体的特异性反应, 结合荧光 PCR, 建立了食品接触材料中双酚 A 在食品模拟物中迁移量的快速、灵敏的间接竞争免疫 PCR 检测方法。通过优化包被抗原浓度、探针 DNA 的量、抗体质量浓度等一系列条件, 双酚 A 的线性质量分数范围在 0.01~10 pg/g 之间, 检测低限为 3.0 fg/g, 4 种食品模拟物中双酚 A 的添加回收率在 82.8%~115.2%, 该方法特异性好、灵敏度高, 适用于食品接触材料中双酚 A 及其他小分子化学物的痕量迁移检测, 为其迁移行为及迁移模型的建立提供了技术支撑。

关键词: 免疫传感; 双酚 A; 迁移; 食品模拟物

中图分类号: Q 789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)09—0941—05

Research of Indirect Immuno-PCR Detection for Migration of BPA in Food Simulants

GONG Qiang¹, DING Li¹, XIAO Jiayong¹, XU Liguang², LUO Sisi³,
JIAO Yanna¹, ZHU Shaohua¹, WEN Jiangwei¹, FU Shanliang¹, WANG Libing^{*1}

(1. Technology Center of Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hunan Key Laboratory of Food Safety Science and Technology, Changsha 410004, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

Abstract: Combine fluorescence PCR and specific antigen-antibody reaction, a rapid and sensitive detection method BPA in food contact materials was developed. After the optimization of the coating antigen concentration, the amounts of probe DNA, and the antibody concentration, BPA detection limit was low as 3.0 fg/g, and the linear concentration range was 0.01~10 pg/g. The recoveries of fruit drinks were 82.8%~115.2%. This method was specific, sensitive, and suitable for trace migration detection research of BPA and other small molecule chemicals.

Keywords: Immuno-PCR, BPA, Migration, Food Simulants

收稿日期: 2013-12-30

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAK10B05, 2012BAD29B05); 国家质检总局公益性专项(201210036)。

作者简介: 龚强(1979—), 男, 江西樟树人, 工学博士, 工程师, 主要从事食品安全与检验检疫安全研究。E-mail: 39235213@qq.com

* 通信作者: 王利兵(1967—), 男, 江苏海门人, 工学博士, 研究员, 主要从事食品安全与检验检疫安全研究。E-mail: wanglb1@163.com

双酚 A(BPA),一种环境内分泌干扰物,对哺乳动物和水生动物的生殖发育会造成不同程度的影响,对生态系统和人类健康产生极大的危害。作为一种广泛应用于塑料制造的化学物质,食品接触材料中含有 BPA,可渗透、迁移进入到食品,对人类健康造成不容忽视的危害。多个国家已对食品接触材料中双酚 A 的迁移量提出相关限量要求。因此食品接触材料中 BPA 迁移的痕量测定已成为各国食品安全检测的新热点^[1-3]。

PCR 技术以快速、简便、特异、产量高等优点,已被越来越多地应用于核酸探针的制备和生物样品的检测。1992 年 Sano^[4]等首次将 PCR 技术引入免疫反应,把抗原抗体反应的强特异性与 PCR 技术的高敏感性、强扩增能力结合在一起,开发了免疫-PCR 技术 (immuno polymerase chain reaction, IPCR)。利用样品中检测目标物与 PCR 反应管中包被抗原竞争结合抗体分子,进而 PCR 扩增与抗体分子偶联的探针 DNA 分子,通过 C_t 值作标准曲线进行定量。已有报道表明,该方法在医学和生物技术领域的研究取得了很好的成果^[5-9],但采用此方法进行小分子的检测相关报道还较少。

目前,对于 BPA 的迁移分析检测方法主要有高效液相色谱法 (HPLC)、液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 和气相色谱质谱法 (GC-MS) 等^[10-13]。本实验基于免疫 PCR 原理,建立了食品接触材料中双酚 A 在食品模拟物中迁移量的间接竞争免疫 PCR 检测方法,与前几类方法相比较,前处理简单、可以批量检测。本方法检测低限为 3.0 fg/g,方法快速、灵敏,适用于食品接触材料中双酚 A 及其他小分子化学物的痕量迁移检测。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

1.1.1 试剂 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯钠盐 (Sulfo-SMCC, Sigma-Aldrich), PBS, NaCl, EDTA, 戊二醛, 吐温-20, 牛血清白蛋白 (BSA), BPA (Sigma-Aldrich), PBS 缓冲液 (pH 7.4), 超纯水, 乙酸, 乙醇, BPA 多克隆抗体, 均由江南大学食品安全科学研究所提供; 超滤管, Millipore 公司产品; SYBR[®] Premix EX Taq[™] II 荧光 PCR 试剂盒, Takara 公司产品。

1.1.2 DNA 分子 Takara 合成。上游引物: 5'-

GGGAAAATGCAAGAAGAAGTCAT-3'; 下游引物: 5'-GCCGAAAAATCTGGAAGGTC-3'; 5' 端巯基修饰探针 (89bp ssDNA): 5'-SH-GGGAAAATGC AAG AAGAAGT CATTAGTCCT AGACAACGTT ACTATA ACGT GAATGTAATG AACCTACAAG ACCTTCCAG A TTTTTCGGC-3'。

1.2 仪器

PRISM 7000 型荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司制造; SA300 型 Shaker, Yamato 公司制造; THERMO Star 微孔板振荡器, 德国 BMG LABTECH 公司制造; Centrifuge 离心机, 美国 Beckman Coulter 公司制造。

1.3 方法

1.3.1 DNA-BPA 抗体偶联物的制备 2.5 mg 双异功能团偶联剂 Sulfo-SMCC 溶解于 1 mL 超纯水, 取 10 μ L 溶于 980 μ L PBS 缓冲液 (含 150 mmol/L NaCl) 中, 加入 10 μ L 96 μ g/mL BPA 抗体溶液, 室温振荡反应 30 min, 用截留相对分子质量为 10 k 的超滤管对反应混合物进行超滤 (5 000 r/min, 水平转子, 离心 50 min), 除去多余的偶联剂。截留物用 990 μ L PBS 缓冲液 (含 5 mmol/L EDTA) 复溶, 加入 10 μ L 1.0 μ mol/L ssDNA, 室温振荡反应 30 min, 反应混合物用截留相对分子质量 30 k 的超滤管进行超滤, 除去未结合的 DNA。截留物再用 1 mL PBS (含 5 mmol/L EDTA) 溶解, 溶解产物即为 DNA-BPA 抗体偶联物。

1.3.2 抗原包被 PCR 管 荧光定量 PCR 管用 50 μ L 质量分数 0.8% 的戊二醛溶液 37 $^{\circ}$ C 包被 5 h, 超纯水振荡洗涤 PCR 管 3 次, 每次 5 min; 50 μ L 0.1 μ g/mL 的 BPA 抗原包被 PCR 管, 37 $^{\circ}$ C 包被 2 h, 100 μ L pH 7.2 PBST (含质量分数 0.05% Tween-20 PBS) 缓冲液振荡洗涤 3 次, 每次 3 min, 再用 100 μ L pH 7.2 封闭液 (质量分数 1% BSA-PBS 缓冲液) 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。上述 PBST 缓冲液振荡洗涤 3 次, 每次 3 min。

1.3.3 免疫传感器的构建 取上述包被好的 PCR 管, 加入 25 μ L 10 倍梯度稀释的 BPA 标准品, 再加入 25 μ L DNA-BPA 抗体偶联物, 标准品中的 BPA 与 PCR 管壁上包被的抗原竞争结合抗体, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min。用 PBST 缓冲液振荡洗涤 3 次, 每次 3 min, 最后将 PCR 管在吸水纸上拍打干净。加入 SYBR[®] Premix EX Taq[™] II 2 $\times$ Buffer 10 μ L, 上游引

物、下游引物各 0.8 μL , ROX Reference Dye 0.4 μL , 灭菌蒸馏水补足到 20 μL 。荧光定量 PCR 仪测定。扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火和延伸 30 s, 40 个循环。获得偶联 DNA 的扩增曲线、熔解曲线。

1.3.4 样品检测 选取 PC 成品型食品接触材料作为检测研究对象, 参照 GB/T 5009.156-2003《食品用包装材料及其制品的浸泡试验方法通则》和 SN/T 2199-2008《食品接触材料 塑料 水状食品模拟物总迁移量试验方法 填充法》, 用水、体积分数 10% 乙醇、质量分数 4% 乙酸, 95 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴浸泡 6 h, 水直接进行免疫 PCR 检测, 体积分数 10% 乙醇、质量分数 4% 乙酸稀释 100 倍后进行免疫 PCR 检测。双酚 A 特定迁移量折合成实际接触面积, 按欧盟 2002/72/EC 法则规定的方法计算。

2 结果与分析

2.1 荧光 PCR 检测

荧光定量 PCR 采用 SYBR[®] Green I 嵌合荧光染料, 从溶解曲线上可见 78 $^{\circ}\text{C}$ 处有单一峰, 无非特异性扩增及引物二聚体, 见图 1。实验中的 SYBR[®] Premix EX Taq[™] II 荧光 PCR 试剂采用 SYBR[®] Green I 嵌合荧光染料, 能够在较宽的范围内进行准确的定量, 具有抑制非特异性反应、再现性好的特性。

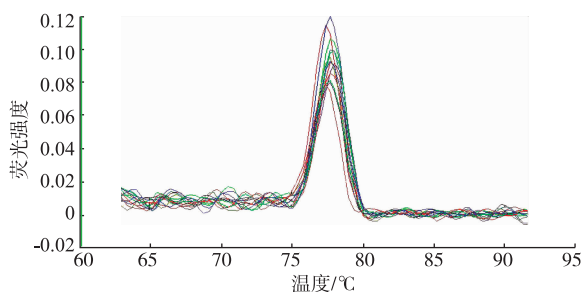


图 1 荧光 PCR 溶解曲线

Fig. 1 Dissociation curve of fluorescence PCR

2.2 包被原、DNA-抗体偶联物浓度的优化

包被原和 DNA-抗体偶联物的质量浓度比例按照 ELISA 棋盘法进行优化, 包被原的质量浓度参照普通 ELISA 的包被质量浓度, 从 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 10 倍梯度稀释至 0.01 ng/mL , 抗体-DNA 偶联物 (抗体 38.4 ng/mL 、DNA 40 nmol/L) 2 倍梯度稀释至 1.2 ng/mL (以抗体质量浓度计), 加入同样质量浓度的 BPA

进行荧光 PCR 反应, 根据同一条件下加入目标物和未加目标物循环数的差值, 选取最合适的质量浓度配比。扩增效率越高, 循环数差值越大, 最终确定包被原质量浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 抗体质量浓度为 9.6 ng/mL , DNA 浓度为 10 nmol/L , 见图 2。

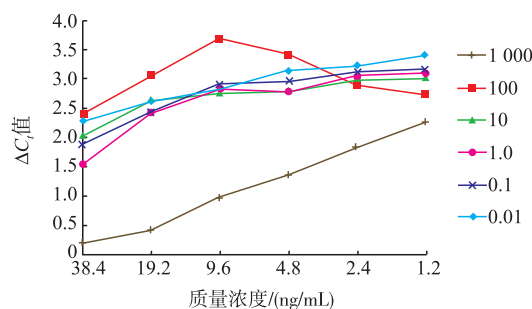


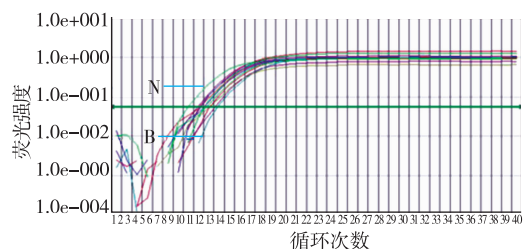
图 2 棋盘优化法 ΔC_t 值

Fig. 2 ΔC_t value of checkerboard optimization method

横坐标为不同抗体-DNA 偶联物浓度 (以抗体质量浓度计), 纵坐标为不同体系中加入目标物和不加目标物循环数 (C_t 值) 的差值, 曲线分别代表不同包被原质量浓度。

2.3 线性范围与检测限

固定包被原质量浓度 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、抗体质量浓度 9.6 ng/mL 、DNA 浓度 10 nmol/L , 优化竞争性 BPA 浓度: 从 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 10 倍梯度稀释至 1.0 fg/mL 。实验结果表明: C_t 值随着加入标准品 BPA 质量浓度的增加而增大, 见图 3, 当 BPA 质量浓度大于 0.1 ng/mL 时, C_t 值与空白对照 (不加 BPA 标准品) 无明显差异。

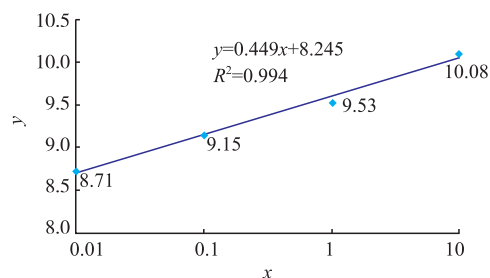


N: 阴性对照(不加竞争性BPA); B: 空白对照(PCR管不用包被原包被)

图 3 竞争性 BPA 浓度条件优化 PCR 扩增曲线

Fig. 3 Optimization Immuno-PCR amplification of competitive BPA

以质量浓度为横坐标, C_t 值为纵坐标绘制标准曲线, 在 10.0 fg/mL ~10.0 pg/mL 质量浓度范围内呈良好的线性关系, 见图 4, 线性方程为 $y=0.449x+8.245$, 相关系数为 0.994 0, 检测底限为 3.0 fg/mL 。



线性范围为:0.01~10.0 pg/mL, BPA 质量浓度为 0.01、0.1、1.0、10.0 pg/mL 时对应的 C_t 值分别为 8.71、9.15、9.53、10.08, 相关系数为 0.994

图 4 BPA 免疫 PCR 检测标准曲线

Fig. 4 Standard curve of BPA by Immuno-PCR

2.4 回收率与精密度

以待测样品进行加标回收率和精密度计算, 选择高 (10.0 pg/mL)、中 (0.5 pg/mL)、低 (0.01 pg/mL) 3 个质量浓度, 分别添加在水、质量分数 4% 乙酸、体积分数 10% 乙醇浸泡样品中, 每个添加平行测定 6 次, 取平均值计算加标回收率和精密度 (见表 1)。

2.5 样品的迁移检测

采用 95 °C 高温浸泡、选择水、质量分数 4% 乙酸、体积分数 10% 乙醇对不同待测样品进行 BPA 迁移检测。结果表明: 不同厂家、不同材质以及相同材

质不同质地的食品接触材料 BPA 的迁移量都不同, 其中相同材质、质地更为紧密的食品接触材料 BPA 迁移量更少。

表 1 样品添加回收率和精密度

Table 1 Recoveries and precisions of samples (n=6)

浸泡样品	迁移本底值/ (pg/mL)	添加质量 浓度/(pg/mL)	平均 回收率/%	精密度/ %
水	0.48	10.0	115.2	12.8
		0.5	102.9	6.4
		0.01	84.6	17.9
质量分数 4% 乙酸	0.41	10.0	113.8	10.9
		0.5	96.4	7.1
		0.01	81.7	14.5
体积分数 10% 乙醇	0.63	10.0	108.6	13.4
		0.5	99.1	4.6
		0.01	82.2	11.5

3 结 语

作者建立了食品接触材料中 BPA 的免疫 PCR 快速检测方法, 方法快速简便。通过对免疫 PCR 方法条件的优化、空白样品的添加回收实验, 以及实际样品的迁移检测, 证实所建立的方法适用于食品接触材料中 BPA 的痕量迁移检测。

参考文献:

- [1] Ballesteros -Gómez A, Rubio S, Pérez -Bendito D. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(3): 449-469.
- [2] 吴新华, 丁利, 肖家勇, 等. 单分散磁性亚微米粒子固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定牛奶中的双酚 A [J]. *色谱*, 2011, 29(5): 399-403.
WU Xinhua, DING Li, XIAO Jiayong, et al. Determination of bisphenol A in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid phase extraction of monodisperse magnetic submicron particles as adsorbent [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2011, 29(5): 399-403. (in Chinese)
- [3] 郭莹莹, 王丽, 赵珺, 等. 食品包装聚碳酸酯成品型双酚 A 检测及迁移特性研究 [J]. *食品工业科技*, 2011, 32(3): 347-353.
GUO Yingying, WANG Li, ZHAO Jun, et al. Determination of bisphenol A and its migration from polycarbonate packaging container [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2011, 32(3): 347-353. (in Chinese)
- [4] Sano T, Smith C L, Cantor C R. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates [J]. *Science*, 1992, 258(5079): 120-122.
- [5] Saito K, Kobayashi D, Sasaki M, et al. Detection of human serum tumor necrosis factor- α in healthy donors, using a highly sensitive immuno-PCR assay [J]. *Clin Chem*, 1999, 45(5): 665-669.
- [6] Sanna P P, Weiss F, Samson M E, et al. Rapid induction of tumor necrosis factor α in the cerebrospinal fluid after intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide revealed by a sensitive capture immuno-PCR assay [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(1): 272-275.
- [7] Zhang W, Bielaszewska M, Pulz M, et al. New immuno-PCR assay for detection of low concentrations of shiga toxin 2 and its variants [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(4): 1292-1297.

- [8] Chye S M, Lin S R, Chen Y L, et al. Immuno-PCR for detection of antigen to *Angiostrongylus cantonensis* circulating fifth-stage worms[J]. **Clin Chem**, 2004, 50(1): 51-57.
- [9] Hasan S, Dong J, Hara Y, et al. Protein-based open sandwich immuno-PCR for sensitive detection of small biomarkers [J]. **Anal Sci**. 2013, 29(9): 871-876.
- [10] Maiolini E, Ferri E, Pitasi A L, et al. Bisphenol A determination in baby bottles by chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay, lateral flow immunoassay and liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. **Analyst**, 2013, 139(1): 318-324.
- [11] Nicolucci C, Rossi S, Menale C, et al. A high selective and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantization of BPA urinary levels in children[J]. **Anal Bioanal Chem**, 2013, 405(28): 9139-9148.
- [12] Chen B, Huang Y, He M, et al. Hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the determination of various environmental estrogens in environmental and biological samples[J]. **J Chromatogr A**, 2013, 1305: 17-26.
- [13] Ballesteros-Gómez A, Rubio S, Pérez-Bendito D. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food [J]. **J Chromatogr A**, 2009, 1216(3): 449-469.

会 议 信 息

会议名称(中文): 第二届全国发育生物学大会

开始日期: 2014-10-16

结束日期: 2014-10-19

所在城市: 甘肃省 兰州市

具体地点: 兰州大学信息学院报告厅

主办单位: 中国细胞生物学会、中国遗传学会、中国动物学会

协办单位: 兰州大学

承办单位: 中国科学院遗传与发育生物学研究所 分子发育生物学国家重点实验室

会议主席: 孟安明

联系人: 甘桔

联系电话: 0931-8912560

传真: 0931-8912561

E-MAIL: jujan@lzu.edu.cn

会议网站: <http://www.cscb.org.cn/news.asp?id=2919>

会议背景介绍: 为促进发育生物学科人员之间的交流与合作, 展示我国发育生物学研究的最新成果和重要进展, 兹定于2014年10月16-19日在兰州召开“第二届全国发育生物学大会”。大会将邀请我国发育生物学领域著名专家学者作学术报告, 诚挚邀请发育生物学科技工作者参加本次大会。

会议名称(中文): 2014 中国生物制品年会暨第十四次全国生物制品学术研讨会

开始日期: 2014-10-30

结束日期: 2014-10-31

所在城市: 江苏省 南京市

具体地点: 南京紫金山庄

主办单位: 中华预防医学会生物制品分会 中国药学会生物药品与质量研究专业委员会

承办单位: 《中国新药杂志》长春生物制品研究所有限责任公司

联系人: 赵文锐 13810503254

联系电话: 010-82282280

传真: 010-82282289

E-MAIL: cbpac@newdrug.cn

会议网站: <http://www.cbpac.org/2014/cn/index.asp>

会议背景介绍: 为促进中国生物制品事业的发展, 搭建专业研究人员在产学研方面的交流与合作平台, 更及时地交流生物制品领域的研究成果、产业转化以及面临的机遇和挑战, 2014 中国生物制品年会暨第十四次全国生物制品学术研讨会定于2014年10月下旬在南京召开。本次大会由中华预防医学会生物制品分会和中国药学会生物药品与质量研究专业委员会共同主办, 《中国新药杂志》与长春生物制品研究所有限责任公司联合承办。届时大会将邀请国内外生物医药领域的著名专家学者进行有关专题进展报告。