

文章编号:1673-1689(2008)03-0037-04

双酚 A 完全抗原的制备

石春红¹, 章银珠¹, 俞晔², 孙秀兰¹, 姚卫蓉^{*1}

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 张家港检验检疫局, 江苏 张家港 215633)

摘 要: 采用重氮化法在双酚 A(BPA)上引入羧基, 将其与牛血清白蛋白(BSA)偶联, 制备双酚 A 完全抗原 BPAH-BSA。紫外扫描光谱和红外光谱实验表明偶联成功, 为进一步制备抗 BPA 抗体提供了良好的免疫原。

关键词: 双酚 A; 完全抗原; 牛血清白蛋白; 紫外扫描光谱; 红外光谱

中图分类号: O 657

文献标识码: A

Study on Preparation of Complete Antigen of Bisphenol A

SHI Chun-hong¹, ZHANG Yin-zhu¹, YU Ye², SUN Xiu-lan¹, YAO Wei-rong^{*1}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Zhangjiagang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhangjiagang 215633, China)

Abstract: Bisphenol A hapten (BPAH) was prepared by diazotization, and then coupled with carrier protein bovine serum albumin (BSA) to prepare complete antigen BPAH-BSA. Both UV scanning and IR spectrum indicated that the complete antigen BPAH-BSA was successfully synthesized. The result present here demonstrated that an excellent immune antigen for further preparation of BPA antibody was achieved.

Key words: bisphenol A; complete antigen; bovine serum albumin; UV scanning spectrum; IR spectrum

双酚 A(Bisphenol A, BPA), 是近几年从食品包装材料中新发现的一种“破坏内分泌的化学物质(Endocrine Disrupting Chemicals, ECD)”, 具有某些雌激素特性^[1-2], 学名为 2,2-双(4-羟基苯基)丙烷。主要用于生产聚碳酸酯(PC)、环氧树脂(EP)、聚砜树脂等高分子材料, 又用作酚酸树脂、可塑性聚酯、抗氧化剂及聚氯乙烯(PVC)的稳定剂。我国是一个食品包装材料生产和使用大国, 许多塑料制品、食具、容器及这些材料包装的各类食品和饮料已成

为人们生活的必需品, 但对这些包装材料中 BPA 的调查研究报道极少。近年来的研究表明, 双酚 A 对淋巴细胞具有增殖作用, 不同剂量的双酚 A 能够诱导淋巴细胞增殖, 从而存在潜在的免疫毒性^[3]。双酚 A 可以通过直接或间接影响生精细胞周期而干扰精子的正常发生, 并支持细胞与生精细胞的分离, 影响生殖功能^[4]。因此, 研制灵敏、高效、稳定的双酚 A 检测方法非常重要。

目前, 双酚 A 的检测方法有气相色谱法

收稿日期: 2007-07-11.

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2007IK271).

作者简介: 石春红(1982-), 女, 浙江绍兴人, 食品安全与质量控制硕士研究生。

* 通讯作者: 姚卫蓉(1970-), 女, 江苏江阴人, 工学博士, 副教授, 主要从事食品安全与质量控制方面的研究。

Email: yaoweirongcn@163.com

(GC)^[5]、气相色谱-质谱法(GC-MS)^[6]、高效液相色谱法(HPLC)^[7-10]、液相色谱-质谱法(LC-MS)^[11]及ELISA^[12-18]法等。双酚A的检测方法以色谱法为主,这些方法虽然灵敏、准确,但检测时间长、耗资大、对人员素质要求高,不适合大量样品的筛选测定。从近年来食品中有毒物质检测技术的发展趋势看,免疫分析法是最有前途的快速检测方法之一,它基于抗原、抗体之间的特异反应,灵敏度高、特异性强、操作简单,不仅适用于大量样品的快速筛选,某些情况下也可以用于确证性检测。

BPA是小分子物质,它本身不具备免疫原性,不能诱导生物机体产生抗体。由于其本身不带有羧基,必须采用化学方法引入羧基,然后将其与蛋白质等大分子载体偶联,从而得到完全抗原,进而制备相应抗体,这也是建立免疫分析方法的前提和关键所在。为探讨简便、快速、特异的免疫分析方法,制备了双酚A完全抗原,这为进一步建立酶联、荧光、化学发光免疫分析法检测双酚A提供了可靠的免疫原。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

TU-1900型双光束紫外可见分光光度计;傅立叶变换红外光谱仪(Nicolet Nexus, KBr压片法);磁力搅拌器;冷冻干燥机;透析袋(MWCO:7000)。

双酚A(BPA, 97%, New Jersey, USA);牛血清白蛋白(BSA, 上海华美生物工程公司);N-羧基琥珀亚胺(NHS, 98%, New Jersey, USA);1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC, 98%, New Jersey, USA);对氨基苯甲酸、亚硝酸钠和N,N-二甲基甲酰胺(DMF)等其它试剂,均为国产分析纯试剂;pH 7.4磷酸盐缓冲溶液(PBS)。

1.2 双酚A半抗原的制备

装有搅拌器与温度计的100 mL的烧杯置于冰浴中,在烧杯中加入质量分数1:2.5的盐酸5 mL, 0.685 7 g(5 mmol)对氨基苯甲酸,搅拌并保持混合物的温度在4℃以下,从伸入到液面下的滴液漏斗中缓慢滴加2.0 mL质量分数25%的NaNO₂溶液,并随时补充冰块以保持溶液温度为4℃。反应1 h后,用K-I淀粉试纸检验,呈蓝色表示已到终点,加入少量尿素除去过量NaNO₂,继续搅拌10 min。用适量10 g/dL NaOH溶解1.141 5 g(5 mmol)双酚A,缓慢滴加到上述反应液中,继续反应1 h,其间不断用NaOH调节溶液pH值至中性,反应结束后静置。用真空抽滤器抽滤,得到的固体

产物用烘干箱烘干。重结晶后得到褐色固体即为双酚A半抗原。

1.3 双酚A完全抗原的制备

用NHS和EDC活化BPAH。BPAH、NHS和EDC的摩尔比率为1:1:1。称取0.112 8 g(0.3 mmol) BPAH, 0.0345 g NHS和0.0575 g EDC,将它们用3 mL DMSO溶解在10 mL的烧杯中,磁力搅拌过夜,所得溶液为A液。称取0.12 g BSA,溶解在5 mL 0.1 mol/L NaHCO₃(用HCl调pH值至7.0),得到BSA溶液。在搅拌下,A液缓慢滴加到BSA溶液中,反应过夜,所得溶液用蒸馏水于4℃透析5 d,前2天每隔8 h换一次透析液(或者更勤),后3天每隔12 h换一次透析液。最后,将溶液冻干,所得固体于-20℃下贮存^[12]。

1.4 完全抗原偶联比的估测

紫外分光光度计法:采用分光光度法进行结合比率的估测。偶联物是由两种分子(蛋白质-半抗原)组成,但偶联物的绝对含量常以蛋白质的相对浓度表示。测定偶联物的浓度与测定偶联物溶液中蛋白质的质量浓度($\mu\text{g/mL}$)是一致的。两种分子均有各自不同的紫外吸收峰,但在偶联物紫外扫描光谱中表现出各自光谱图迭加的性质。所以,用考马斯亮蓝染色法(Bradford法)^[14]确定蛋白质含量,然后再按照测定后的含量配制浓度相同的BSA标准液。由它们的紫外光谱来鉴定BPAH-BSA的合成。

1.4.1 摩尔吸光系数 ϵ 的测定 配制BPA质量浓度为0、10、20、30 $\mu\text{g/mL}$ 的甲醇溶液,通过紫外扫描可知BPA的最大吸收波长为279 nm,在279 nm处测吸光值,每个浓度做平行样。

$$\text{摩尔吸光系数 } \epsilon = \frac{\text{吸光值}}{\text{摩尔浓度}}$$

1.4.2 偶联物蛋白质浓度测定 根据在一定质量浓度范围内吸光值与浓度成正比的原理,配制BSA质量浓度为0、20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$ 的磷酸盐缓冲溶液,各取1.0 mL,加入5 mL考马斯染色液,立即混匀,30℃水浴温热5 min,每个浓度做平行样。在595 nm处测吸光值,做标准曲线。以上述方法处理偶联物,对照标准曲线即可得到偶联物的蛋白质质量浓度。

1.4.3 偶联比测定 配制200 $\mu\text{g/mL}$ BSA的PBS溶液,将已测知蛋白质浓度的偶联产物用PBS稀释到200 $\mu\text{g/mL}$,在279 nm处测吸光值,以PBS为空白,吸光值为 A_1 、 A_2 。双酚A偶联物的偶联比为:

$$r = \frac{A_2 - A_1}{\frac{\epsilon}{200 \times 10^{-3}}} = \frac{A_2 - A_1}{65000}$$

其中 ϵ 为摩尔吸光系数(L/mol),65 000 为 BSA 的摩尔质量(g/mol), 200×10^{-3} 为 BSA 质量浓度(g/L)。

2 结果与分析

2.1 完全抗原的紫外扫描

BPA 完全抗原的紫外扫描图见图 1。对比 3 条曲线可以看出,BSA 在 204 nm 和 278 nm 处有特征吸收峰,BPA 半抗原在 362 nm 处有特征吸收峰,而两者的偶联物在 204 nm 和 353 nm 处有特征吸收峰,这是由于两者吸收峰的迭加效应,使出现的 2 个特征吸收峰与 BPA 半抗原和 BSA 的吸收峰相比,有一定的位移。因此可以初步判断,BPA 半抗原已与蛋白质发生偶联,成为完全抗原。

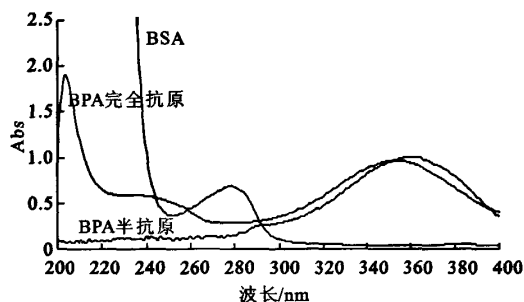


图 1 完全抗原的紫外扫描图

Fig. 1 The UV scanning spectrum of complete antigen

2.2 半抗原以及完全抗原的红外光谱

双酚 A 半抗原红外光谱图见图 2。从对氨基苯甲酸的图谱上可以看出,在 $3\,500 \sim 3\,300\text{ cm}^{-1}$ 区域有中等强度吸收峰,伯胺基 ($-\text{NH}_2$) 因振动偶合呈现双峰。从双酚 A 半抗原图谱上,看不到胺基的振动,这是因为经重氮化后胺基消失;但是,在 $3\,500 \sim 3\,200\text{ cm}^{-1}$ 区域相对于双酚 A 图谱来说,双酚 A 半抗原在 $3\,305\text{ cm}^{-1}$ 处有明显的羧基吸收峰。说明双酚 A 上已引入了羧基,它可以与蛋白质大分子偶联。

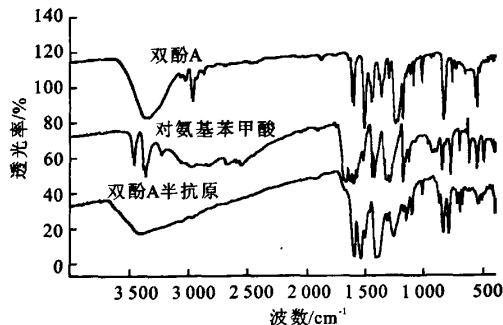


图 2 双酚 A 半抗原红外光谱图

Fig. 2 IR spectrum of bisphenol A hapten

双酚 A 完全抗原的红外光谱图见图 3。将完全抗原的红外光谱与 BSA 的红外光谱比较,它们在

$3\,500 \sim 3\,200\text{ cm}^{-1}$ 区域,以及 $1\,660 \sim 1\,500\text{ cm}^{-1}$ 区域具有相似的吸收峰。这是蛋白质中氨基酸产生的特征峰,说明合成的完全抗原中确实含 BSA。再将完全抗原的红外光谱与双酚 A 半抗原的红外光谱相比较,它们在 $1\,700$ 、 $1\,140$ 、 $1\,000\text{ cm}^{-1}$ 附近具有相似的吸收,而 BSA 在此处无吸收,说明在合成的完全抗原中含有双酚 A 半抗原。由此判断,双酚 A 半抗原与 BSA 偶联成功。

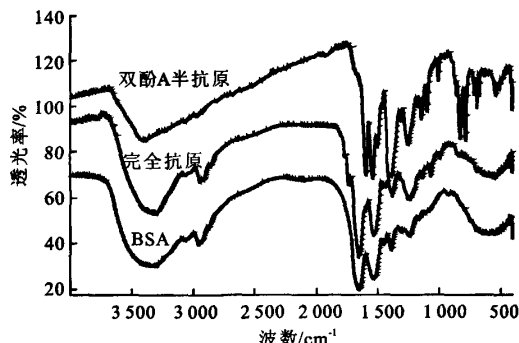


图 3 完全抗原的红外光谱图

Fig. 3 IR spectrum of complete antigen

2.3 完全抗原偶联比的估测

以吸光度(Y)对相应的质量浓度(X)作标准曲线,回归方程为 $Y = 0.004\,7X + 0.098\,3$, $R = 0.998\,8$ 。参照标准曲线制作步骤,取待测样品 0.2 mL ,最后测得 $\text{OD}_{595\text{ nm}}$ 值为 0.287 ,对照标准曲线方程知,蛋白质质量浓度为 $40.1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。由此可知,样品的实际质量浓度为 $200.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。在 279 nm 处其吸光值为 0.860 ,同浓度的 BSA 的吸光值为 0.492 。双酚 A 最终的平均摩尔吸光系数为 $9\,792.4\text{ L/mol}$,见表 1。根据计算公式,则 BPA 偶联物的偶联比为:

$$r = \frac{0.860 - 0.492}{\frac{9\,792.4}{200 \times 10^{-3}}} = 12.1$$

表 1 BPA 摩尔吸光系数测定数据

Tab. 1 The data of BPA molar absorptivity

BPA 质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	吸光值		平均 值	摩尔 消光系数/ (L/mol)	平均摩尔 吸光系数/ (L/mol)
	1	2			
0	0	0	0	—	9 792.4
10	0.428	0.430	0.429	9 794.9	
20	0.856	0.855	0.856	9 772.1	
30	1.289	1.289	1.289	9 810.2	

连接到蛋白质分子上的半抗原数目并非越多越好,太多或太少均能导致弱的免疫应答。制备免疫原时,载体蛋白分子中连接的半抗原分子过多,不仅增加偶联物制备过程中的麻烦(如出现沉淀,要求分离纯化等),还有可能不利于载体与淋巴细

胞表面结合,不能使载体引起免疫反应。在不同的实验条件和要求下,每个载体蛋白质分子上结合多少个小分子为最佳,有不同的答案。一般认为,每个BSA分子上连接5~20个半抗原为宜。李俊锁等^[15]认为以血清蛋白为载体,偶联比一般应以10左右为宜,而且低偶联比有助于提高抗体的选择性和亲和力。作者制备的完全抗原偶联比的估测值为12.2,因此可以认为获得了具有较好偶联比的完全抗原。

此外,由于目前对半抗原与载体蛋白质结合比的测定还没有一个标准的方法,不同的学者采用的方法也不尽相同,因此结合比的报道只是提供比较粗略的分析,而非绝对意义上的结合比。

参考文献(References):

- [1] 贾凌志,李君文. 环境中双酚A的污染及降解去除的研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2004,21(2):120-122.
JIA Ling-zhi, LI Jun-wen. Pollution of bisphenol A and advancement of degradating and removing[J]. *Journal of Environment and Health*, 2004,21(2):120-122. (in Chinese)
- [2] Iso T, Watanabe T, Iwamoto T, et al. DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity[J]. *Biol Pharm Bull*, 2006(29):206-210.
- [3] 尹大强,胡双庆,朱坤宁,等. 双酚A和几种天然激素对鲫鱼淋巴细胞增殖的影响[J]. 中国环境科学,2002,22(5):392-396.
YIN Da-qiang, HU Shuang-qing, ZHU Kun-ning, et al. Effects of bisphenol A and several natural hormones on lymphocyte proliferation of fish (*Carassius auratus*) [J]. *China Environment Science*, 2002,22 (5):392-396. (in Chinese)
- [4] 靳翠红,赵剑,金一和,等. 双酚A对雄性小鼠生殖系统的影响[J]. 中国医科大学学报,2002,31(2):123-124.
JIN Cui-hong, ZHAO Jian, JIN Yi-he, et al. Effects of bisphenol A on the reproductive system of male mice[J]. *Journal of China Medical University*, 2002,31(2):123-124. (in Chinese)
- [5] Romero J, Ventura F, Gomez M. Characterization of paint samples used in drinking water reservoirs: identification of endocrine disruptor compounds[J]. *J Chromatogr Sci*, 2002,40(4): 191-197.
- [6] 王玉飞,陈衡平,陈晖. 桶装饮用水中双酚A的溶出及GC/MS分析[J]. 中国卫生检验杂志,2003,13(5):581-582.
WANG Yu-fei, CHEN Heng-ping, CHEN Hui. Detection of bisphenol A in barreled drinking water by GC/MS[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory*, 2003;13(5):581-582. (in Chinese)
- [7] 张文德. 食品及包装材料中双酚A的残留和检测方法[J]. 理化检验-化学分册,2001,37(4):188-191.
ZHANG Wen-de. Detection of residual bisphenol A in foodstuffs and packing materials[J]. *Physical Testing and Chemical Analysis Part B(Chemical Analysis)*, 2001,37(4):188-191. (in Chinese)
- [8] Sun C, Leong L P, Barlow P J, et al. Single laboratory validation of a method for the determination of bisphenol A, Bisphenol A diglycidyl ether and derivatives in canned foods by reversed liquid chromatography[J]. *Chromatogr A*, 2006, 1129(1):145-148.
- [9] 梁志坚,刘艳和,刘贵明,等. 塑料制品中双酚A高压液相色谱测定[J]. 中国公共卫生,2005,21(9):1146-1147.
LIANG Zhi-jian, LIU Yan-he, LIU Gui-ming, et al. Detection of bisphenol A in plastics by high performance liquid chromatography[J]. *China Public Health*, 2005,21(9):1146-1147. (in Chinese)
- [10] Nerin C, Philo M R, Salafraña J, et al. Determination of bisphenol-type contaminants from food packaging materials in aqueous foods by solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography[J]. *Chromatogr A*, 2002(963):375-380.
- [11] Inoue K, Yamaguchi A, Wada M, et al. Quantitative detection of bisphenol A and bisphenol A diglycidyl ether metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry[J]. *Chromatogr B*, 2001(765):121-126.
- [12] Zhao M, Li Y, Guo Z, et al. A new competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of estrogenic bisphenols[J]. *Talanta*, 2002(57):1205-1210.
- [13] Meulenaer B D, Baert K, Lanckriet H, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for bisphenol A using chicken immunoglobulins[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(19): 5273-5282.
- [14] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2002:42-47.
- [15] 李俊锁,钱传范. 兽药残留免疫分析及其进展[J]. 中国兽医学报,1998,18(4):411-415.
LI Jun-suo, QIAN Chuan-fan. Progress on immunoassay for veterinary drug residues[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 1998,18(4):411-415. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)