

高有机溶剂耐受性的苯并(a)芘单克隆抗体 制备及其免疫反应特性研究

孙 清^{1,2,3}, 黄刚锋³, 史亚利^{1,2*}, 时国庆^{3*}, 蔡亚岐^{1,2}

(1. 国科大杭州高等研究院环境学院, 杭州 310024; 2. 中国科学院生态环境研究中心环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085; 3. 北京科技大学化学与生物工程学院, 北京 100083)

摘要: **目的** 制备适应油脂样品中苯并(a)芘[benzo(a)pyrene, BaP]检测需求的抗 BaP 单克隆抗体。**方法** 利用杂交瘤单克隆抗体技术制备抗 BaP 的抗体, 在抗体筛选过程中使用高浓度的有机溶剂(50%甲醇)来选择具有较高有机溶剂耐受能力的抗体, 并利用间接竞争酶联免疫吸附法考察抗体的免疫反应特性。**结果** 筛选获得一株对有机溶剂有较高耐受能力的、稳定分泌 BaP 单克隆抗体的细胞株 2H10, 该抗体为 IgG₁ 亚型, 可耐受高浓度的甲醇、丙酮、二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)和二甲基甲酰胺(dimethylformamide, DMF)。60% 甲醇和 60% DMSO 作为样品稀释液时, 抗体对 BaP 的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 分别为 81.4 和 24.5 ng/mL, 以 60% DMSO 作为样品稀释液, 可以降低 BaP 抗体对其他多环芳烃化合物的交叉反应率。**结论** 本研究获得高特异性的 BaP 人工抗原及高有机溶剂耐受性的抗 BaP 单克隆抗体。

关键词: 苯并(a)芘; 单克隆抗体; 有机溶剂耐受; 酶联免疫吸附测定

Preparation of monoclonal antibody to benzo(a)pyrene with high organic solvent tolerance and characterization of its immune response

SUN Qing^{1,2,3}, HUANG Gang-Feng³, SHI Ya-Li^{1,2*}, SHI Guo-Qing^{3*}, CAI Ya-Qi^{1,2}

(1. School of Environment, Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310024, China; 2. State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 3. School of Chemistry and Biological Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China)

ABSTRACT: Objective To prepare monoclonal antibodies against benzo(a)pyrene (BaP) to meet the needs of BaP detection in oil samples. **Methods** A monoclonal antibody against BaP were prepared by hybridoma technique. A high concentration of organic solvent (50% methanol) was used in the antibody screening process to select antibodies with high tolerance to organic solvents, and the immunoreactivity characteristics of the antibody were investigated by

基金项目: 国家自然科学基金项目(22176198)、中央高校基本科研业务费项目(FRF-BR-20-03B)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (22176198), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (FRF-BR-20-03B)

*通信作者: 史亚利, 研究员, 主要研究方向为新型有机污染物分析方法及环境行为研究。E-mail: shiyali@rcees.ac.cn

时国庆, 副教授, 主要研究方向为环境与食品中污染物的快速免疫检测技术, 体外诊断技术研究。E-mail: shiguqing@ustb.edu.cn

*Corresponding author: SHI Ya-Li, Professor, Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, 18 Shuangqing Road, Haidian District, Beijing 100085, China. E-mail: shiyali@rcees.ac.cn

SHI Guo-Qing, Associate Professor, University of Science and Technology Beijing, 30 Xueyuan Road, Haidian District, Beijing 100083, China. E-mail: shiguqing@ustb.edu.cn

indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** A cell line 2H10 with high tolerance to organic solvents and stable secretion of monoclonal antibody against BaP was screened. The antibody (IgG₁ isotype) could tolerate high concentrations of methanol, acetone, dimethyl sulfoxide (DMSO), and dimethylformamide (DMF). The half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) of the antibody against BaP were 81.4 and 24.5 ng/mL when 60% methanol and 60% DMSO were used as the sample diluents, respectively. Using 60% DMSO as the sample diluent reduced the cross-reactivities of the BaP antibody against other polycyclic aromatic hydrocarbons compounds. **Conclusion** In this study, an artificial antigen with high specificity of BaP and an anti-BaP monoclonal antibody with high tolerance to organic solvents have been obtained.

KEY WORDS: benzo(a)pyrene; monoclonal antibody; organic solvent tolerance; enzyme-linked immunosorbent assay

0 引言

苯并芘是苯与芘稠合而成的一类多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)。根据稠合的位置不同,有苯并(a)芘[benzo(a)pyrene, BaP]和苯并(e)芘两种异构体,其中的 a、e 分别表示苯环与芘分子环中各化学键的连接位置(图 1)。最常见的苯并芘是 BaP, BaP 具有强致癌、致突变性,是世界卫生组织认定的第一类致癌物^[1],在美国毒物和疾病登记署发布的最危险环境物质优先清单中的 275 种化学品中位列第 8^[2]。BaP 主要产生于煤焦油生产^[3]、木材及有机质燃烧^[4]、汽油煤油等燃烧^[5]、植物油加工^[6]、食品煎炸^[7]等过程,在环境及食品中分布非常广泛^[8-9]。因此,开发 BaP 监测的检测方法,对于保障人民群众健康具有重要意义。

目前 BaP 的检测,最常用的是高效液相色谱-质谱法、气相色谱-质谱法、液相色谱-荧光法等^[10-13]。这些依靠大型仪器的方法具有灵敏度高、准确性好的特点,但是由于需要昂贵的设备、复杂的样品前处理过程、熟练的技术人员,因此难以用于基层食品药品检测所及中小企业进行食品及原材料中 BaP 的残留检测。基于酶联免疫检测技术

(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和胶体金免疫层析技术的快速免疫检测方法由于具有仪器成本低、样品前处理简单、可以同时检测大量样品等优点,目前已应用于多种污染物的快速检测^[14-16],在环境污染和食品安全监测工作中发挥了重要作用。近年来,一些 BaP 免疫检测技术也陆续报道。例如,BELOGLAZOVA 等^[17]建立了 BaP 的凝胶免疫分析方法,实现了对地表水、雪水和自来水中 BaP 的检测。李鑫等^[18]利用抗 BaP 的单克隆抗体建立了 BaP 的免疫传感器法,可以在 10 min 内完成自来水中 BaP 的快速检测。陈超超等^[19]研制了检测 BaP 的间接竞争 ELISA 方法,适用于大批量水体样品中 BaP 的检测。虽然这些方法灵敏、快速,但是这些方法都只是用于水体样本中 BaP 残留检测。由于 BaP 强脂溶性结构特点, BaP 更容易在动物脂肪或植物油脂样品中富集^[20-22]。因此,开发油脂样品中 BaP 的免疫检测方法更有应用价值。

一般免疫反应需要在水相中进行,而油脂样品中的非极性化合物由于具有很强的脂溶性,在提取净化过程中难以将其与油脂或非极性有机溶剂分离干净。如果用水相将有机提取液稀释,则部分非极性化合物将转移回残留的油脂或非极性有机溶剂中,从而使检测灵敏度大大降低。

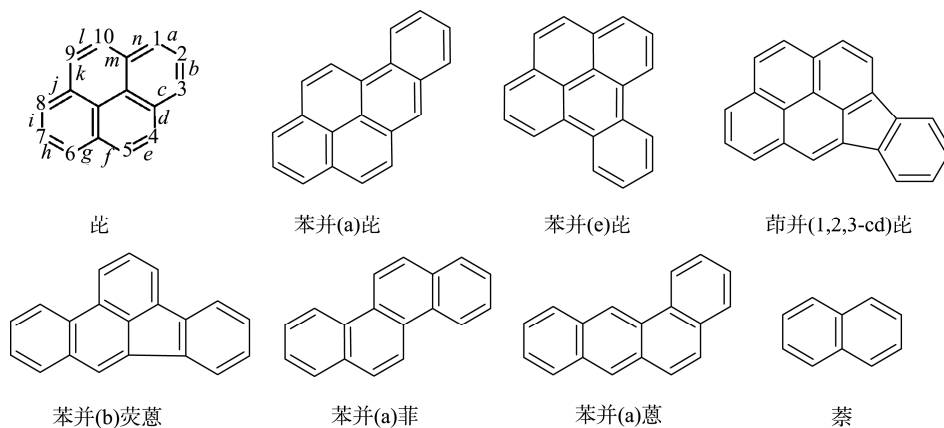


图 1 苯并(a)芘及其类似物的化学结构
Fig.1 Chemical structures of BaP and its analogs

为克服这一难题, 可以筛选能够耐受有机溶剂的抗体, 使免疫反应在有机相或含有高浓度有机溶剂的溶液中进行, 以提高检测灵敏度并简化样品前处理操作^[23-24]。例如, 日本 Miyake S 团队筛选了能耐受高浓度甲醇或乙腈溶液的黄曲霉毒素总量及赭曲霉毒素单克隆抗体, 并开发成功了相应免疫亲和柱^[25-26]。意大利 Mauro Tomassetti 团队成功采用有机相免疫传感检测技术实现了有机溶剂提取物中农药残留的直接检测^[27-28]。BaP 是一种脂溶性非常强的化合物, 在油脂样品中有很高的溶解度。在对油脂样品中的 BaP 含量进行监测时, 不可免地需要使用高浓度有机溶剂来提取 BaP。制备能够耐受有机溶剂的抗体, 使免疫反应在有机相或含有高浓度有机溶剂的溶液中进行, 可以提高检测灵敏度并简化样品前处理操作。目前, 多数有关 BaP 检测的 ELISA 方法, 反应时甲醇终浓度均不超过 10%^[19,29], 能够耐受高浓度有机溶剂的 BaP 抗体暂未见报道。

本研究以 50% 甲醇作为 ELISA 反应时的样品稀释液(反应体系中甲醇终浓度为 25%), 对分泌 BaP 单克隆抗体的融合 SP2/0 细胞进行筛选, 得到一株对有机溶剂有高耐受性的 BaP 单克隆抗体细胞株 2H10, 并对该抗体的免疫反应特性进行了考察, 为今后进一步研制 BaP 的 ELISA 试剂盒、免疫层析试纸条等免疫分析产品提供重要的元件及理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

实验动物 BALB/C 小鼠及 SP2/0 细胞购自中国人民解放军军事医学科学院。

苯并(a)芘(色谱纯, 梯希爱化成工业发展有限公司); 苯并(c)芘、芘、苯并(a)菲、苯并(a)蒽、苯并(b)荧蒽、茚并(1,2,3-cd)芘、萘、正丁醇、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride, EDC]、N-羟基丁二酰亚胺(N-hydroxy succinimide, NHS)(分析纯, 百灵威科技有限公司); 三氯氧磷(POCl₃, 分析纯, 西亚化学科技有限公司); N-甲基甲酰苯胺(N-methylformanilide, MFA)、二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、二甲基甲酰胺(dimethylformamide, DMF)(分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 羧甲基羟胺半盐酸盐(carboxymethoxylamine hemihydrochloride, CMO)、三乙酰氧基硼氢化钠[Na(AcO)₃BH](分析纯)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、鸡卵清白蛋白(ovalbumin, OVA)(试剂级)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司]; HAT、HT、DMEM 培养基(赛默飞世尔科技有限公司); PEG4000(分析纯, 德国 Serva 公司); 胎牛血清(上海依科赛生物科技有限公司); HRP 标记羊抗鼠 IgG、免疫球蛋白亚型试剂盒(美国 Southern Biotech 公司); 聚苯乙烯酶标板、96 孔及 24 孔细胞培养板(丹麦 Nunc 公司); Protein A 亲和柱(GE 医疗生命科学部)。

1.2 仪器与设备

Enspire 多模式读板机(美国珀金埃尔默公司); UV-4802 紫外-可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司); MCO-15AC 二氧化碳培养箱(日本三洋电器集团)。

1.3 实验方法

1.3.1 BaP 人工抗原的合成

BaP 人工抗原合成路线^[30-31]如图 2 所示。称取 180 mg BaP 纯品加入茄形瓶中, 加入 1.0 mL POCl₃ 和 0.2 mL MFA, 95°C 加热回流 2 h。反应结束后将反应液减压蒸馏, 将得到的红棕色黏稠物滴加到约 5 g 的碎冰中, 摇晃, 待析出大量的黄色固体后, 过滤。将滤饼用 10 mL 水洗涤 2 次后转移至茄形瓶中蒸干, 得到黄色的固体。取得到的黄色固体置于茄形瓶中, 加入 10 mL 甲醇溶解, 再加入 117 mg CMO 以及 0.2 mL 的三乙胺, 95°C 加热反应 1 h。将反应液冷却至室温后, 称取 200 mg Na(AcO)₃BH 加至反应溶液中, 继续室温搅拌 16 h。将反应混合物减压蒸干, 缓慢滴加 5 mL 稀盐酸(1 mol/L)后室温搅拌 30 min。待析出大量的黄色固体后, 过滤, 将滤饼用 10 mL 水洗涤 2 次, 再将滤饼用甲醇重溶, 过硅胶柱纯化, 挥干后得到苯并芘衍生物 3(图 2, 化合物 3)。称取 5.0 mg 化合物 3 置于 4 mL 的离心管中, 滴加 0.675 mL 的 EDC 溶液(20 mg/mL)和 0.4 mL 的 NHS (10 mg/mL)至离心管中, 避光、室温振荡 20 h 得到活化的羧酸溶液。取 0.4 mL 活化的羧酸溶液加到盛有 1.15 mL BSA 溶液(10 mg/mL)的 4 mL 离心管中, 室温搅拌 5 h 得到 BaP 人工抗原。将反应液装入透析袋中, 用磷酸盐缓冲液(pH 7.4, 0.01 mol/L)透析 3 d。收集透析袋内的液体, 即为制得的人工抗原 BaP-BSA。利用类似方法将化合物 3 与 OVA 溶液反应, 得到人工抗原 BaP-OVA。

利用紫外吸收光谱对 BaP-BSA 人工抗原进行鉴定, 并按照公式(1)计算 BaP 在 BSA 上的偶联率^[32]。

$$\text{偶联率} = \frac{\epsilon_{(\text{BaP-BSA})} - \epsilon_{\text{BSA}}}{\epsilon_{\text{BaP}}} \quad (1)$$

其中, $\epsilon_{(\text{BaP-BSA})}$ 为 BaP-BSA 人工抗原在 385 nm 处的摩尔吸光系数, ϵ_{BSA} 和 ϵ_{BaP} 分别为 BSA 和化合物 3 在 385 nm 处的摩尔吸光系数。

1.3.2 小鼠免疫及细胞融合

用 BaP-BSA 人工抗原皮下注射 6~8 周的 BALB/c 小鼠, 每次免疫量 100 μg/只, 第一次免疫将抗原溶于 0.5 mL 生理盐水, 再与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化后注射小鼠, 第 2 次和第 3 次免疫时将抗原溶于 0.5 mL 生理盐水, 再与等体积的弗氏不完全佐剂充分乳化后注射, 免疫间隔时间为 21 d。细胞融合前 3 d 采取腹腔直接注射法进行加强免疫, 免疫抗原量为 100 μg/只, 融合前取血清测抗体效价。取免疫 BALB/c 小鼠的脾细胞与 SP2/0 细胞在 PEG4000 介导下进行融合, 置于 96 孔细胞培养板中, 在 CO₂ 培养箱中, 37°C 培养。

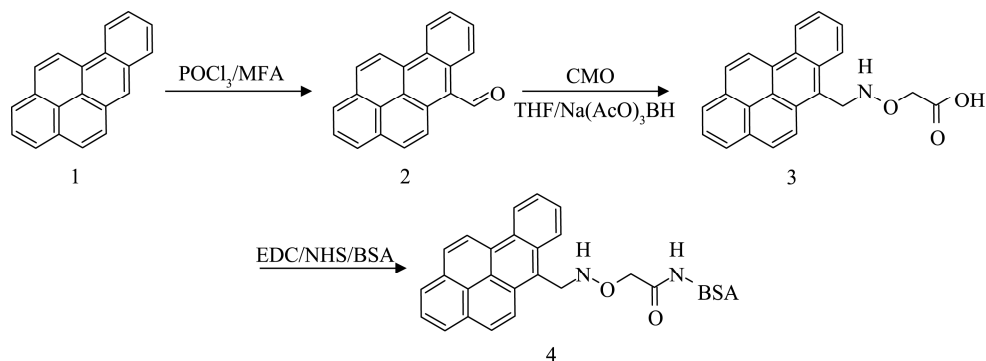


图 2 BaP-BSA 人工抗原合成路线
Fig.2 Synthesis route of BaP-BSA antigen

1.3.3 高有机溶剂耐受性单克隆抗体细胞株的筛选及抗体制备

首先以 BaP-OVA 为包被原, 间接 ELISA 法筛选阳性克隆细胞株。然后, 取细胞上清液稀释至一定浓度, 以 50% 甲醇溶解的 BaP 为抑制剂, 采用间接竞争 ELISA 法筛选分泌量高, 且能够识别 BaP 的细胞株。

对上述筛选到的细胞株用有限稀释法亚克隆 3 次, 采用动物体内诱生产腹水法制备单克隆抗体。采用 Protein A 亲和柱对腹水进行抗体纯化。利用免疫球蛋白亚型试剂盒对纯化后抗体进行亚型分析。

1.3.4 单克隆抗体对有机溶剂的耐受性

采用间接 ELISA 法考察抗体对甲醇、丙酮、DMSO 和 DMF 的耐受性。方法是在用 BaP-OVA 包被, 并经 1% BSA 封闭的酶标板上先加入 50 μL 含不同比例有机溶剂的水溶液, 然后每孔加入 50 μL 抗体溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min 后, 洗涤, 加酶标二抗温育 60 min 后洗涤, 加底物显色。

用上述含不同比例有机溶剂的水溶液配制不同质量浓度 BaP 溶液(1000.0、333.3、111.1、37.0、12.3、4.1、0 ng/mL), 采用间接竞争 ELISA 法绘制标准曲线, 计算其半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 值。考察不同有机溶剂对于 BaP 检测灵敏度的影响。

1.3.5 单克隆抗体对不同 PAHs 化合物的交叉反应性

利用间接竞争 ELISA 法测定单克隆抗体对苯并(e)芘、芘、苯并(a)菲、苯并(a)蒽、苯并(b)荧蒽、茚并(1,2,3-cd)芘、萘等 PAHs 的竞争抑制曲线, 计算各 PAHs 对抗体与包被抗原结合的 IC_{50} 值。根据公式(2)计算单克隆抗体对不同 PAHs 的交叉反应率。

$$\text{交叉反应率}/\% = \frac{\text{BaP } \text{IC}_{50}\text{值}}{\text{PAHs } \text{IC}_{50}\text{值}} \times 100\% \quad (2)$$

1.4 数据处理

采用 Excel 2019 进行数据分析及处理, 并用 Excel 2019 进行作图。

2 结果与分析

2.1 BaP-BSA 人工抗原的制备

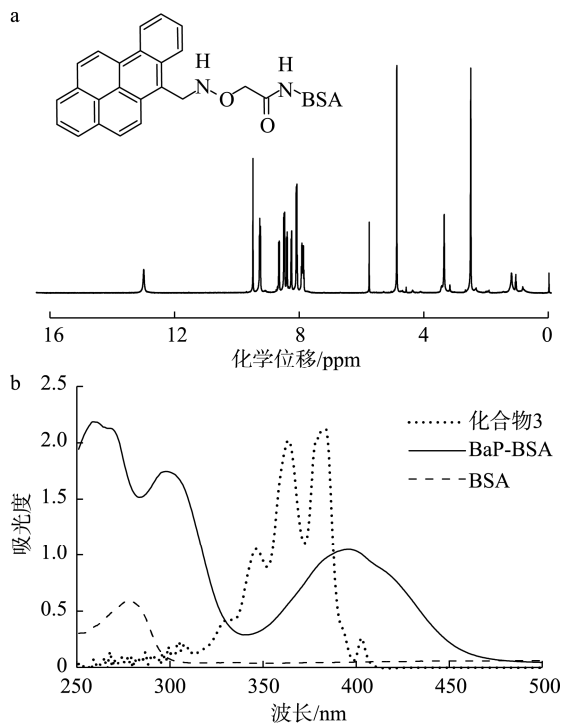
苯并芘是由苯和芘稠合而成的, 其结构上没有适当的官能团能够与蛋白偶联得到免疫原。因此, 需要用适当的化学方法在芳香环上引入相应的官能团才能够与蛋白偶联。如图 2 所示, 第一步以苯并芘为原料, 通过与 POCl_3 和 MFA 回流得到化合物 2, 以此在苯并芘上引入醛基; 第二步, 化合物 2 的醛基与 CMO 的还原胺化得到末端羧基的苯并芘衍生物 3。苯并芘衍生物 3 端位具有羧基, 可以与蛋白质的氨基形成酰胺键, 利用 EDC 和 NHS 催化苯并芘衍生物 3 和 BSA 偶联即可得到小分子与蛋白的偶联物 4。

通过核磁共振波谱对衍生物 3 进行了鉴定(图 3a), 图谱解析结果如下: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 13.01 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 9.29~9.26 (m, 2H), 8.67 (d, $J=6.0$), 8.52~8.48 (m, 2H), 8.41 (d, $J=6.0$), 8.27 (d, $J=6.0$), 8.11~8.08 (m, 2H), 7.95~7.87 (m, 2H), 4.89 (s, 2H), 这表明衍生物 3 合成成功。

与蛋白偶联后的人工抗原经透析、调整至与标准 BSA 溶液浓度相同后, 经紫外可见光谱扫描, 结果如图 3b 所示, 合成的化合物 3 在 345、363 和 385 nm 有较强的吸收峰。人工抗原 BaP-BSA 在 256、304 和 394 nm 处有明显吸收, 与化合物 3 相比具有明显不同的紫外吸收特征, 显示偶联成功。选择化合物 3 在 385 nm 处的光吸收, 根据郎伯-比尔公式分别计算半抗原、人工抗原、载体蛋白 BSA 在该波长处的摩尔吸光系数, 计算得 BaP 在载体蛋白上得偶联率为 23:1。

2.2 单克隆抗体的制备与筛选

将融合的细胞进行充分稀释, 使分配到培养板的每一孔中的细胞数在 0 至数个细胞之间, 培养后取上清以 ELISA 法选出抗体高分泌性的细胞。将阳性细胞进行克隆化, 通过竞争 ELISA 法筛选出 3 株对 BaP 具有识别能力的细胞株。经 3 次亚克隆后, 得到 1 株稳定分泌 BaP 抗体的细胞株, 命名为 2H10。细胞注射入经产期小鼠腹腔制备腹水, 腹水经 Protein A 柱纯化后, 利用小鼠免疫球蛋白亚型酶联免疫检测试剂盒检测抗体亚型为 IgG_1 。



注: a: 核磁共振波谱鉴定化合物 3; b: 人工抗原的紫外可见光谱鉴定。

图 3 人工抗原的鉴定

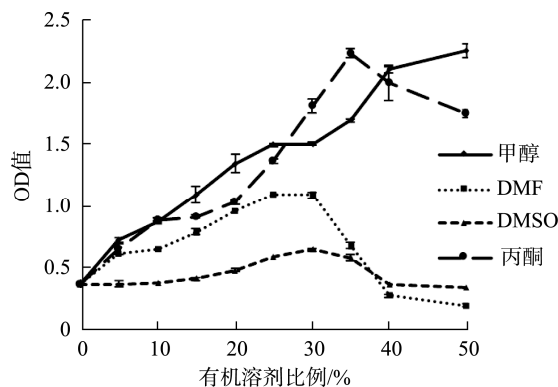
Fig.3 Identification of artificial antigens

2.3 抗体对有机溶剂的耐受性研究

利用间接 ELISA 法考察了单克隆抗体对甲醇、丙酮、DMSO 和 DMF 的耐受性, 结果如图 4 所示。结果表明, 当使用甲醇作为样品稀释液时, 酶标孔 450 nm 处的光密度 (optical density, OD) 值随甲醇含量的升高而增加, 而对于丙酮、DMSO 和 DMF 来说, 则是 OD 值随有机物含量升高呈先增加后降低趋势。酶标孔 OD 值的升高, 表明固定化抗原与抗体的结合能力在增加, 这可能与抗体是在 25% 甲醇条件下筛选得到有关, 一定浓度的有机溶剂有利于维持抗体的活性。高浓度有机溶剂下 OD 值的下降, 主要是由于抗体在较高浓度有机溶剂中发生了变性, 导致活性下降。

对于每种有机溶剂, 选择间接 ELISA 法中 OD 值较高的 3 个不同比例有机溶剂(对于甲醇、丙酮, 反应体系中有有机溶剂最终比例为 20%、30%、40%; 对于 DMSO 和 DMF, 反应体系中有有机溶剂最终比例为 20%、30%、35%) 配制 BaP 标准溶液, 进一步考察了不同有机溶剂对间接竞争 ELISA 检测 BaP 灵敏度(以 IC_{50} 表示)的影响(图 5), 结果表明有机溶剂比例不同显著影响间接竞争 ELISA 法检测 BaP 的灵敏度。从图 5 可以看出, 当甲醇和 DMSO 终浓度从 20% 提高至 30%, 两个体系下 ELISA 方法的 IC_{50} 值均有下降, 这表明在甲醇和 DMSO 浓度提高时, 添加了同一个浓度 BaP 的酶标孔中, 更多的抗体被游离抗原所结合。因此, 这也就

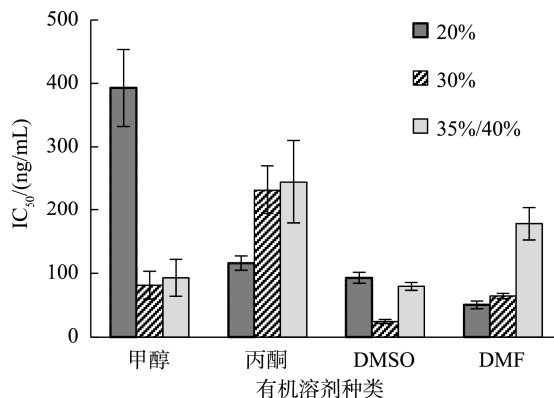
明了游离抗原与抗体的结合能力增强, 结合图 4 甲醇和 DMSO 体系下 OD 值都在升高的结果, 可以判断此时游离抗原与抗体的结合能力所增强的幅度比固定化抗原和抗体的结合能力增强的幅度大。类似的, 当丙酮和 DMF 的浓度从 20% 增加到 30% 时, IC_{50} 值均有升高, 这表明丙酮和 DMF 浓度的提高, 使固定化抗原和抗体的结合能力增强幅度大于游离抗原和抗体的结合能力增强幅度。



注: 有机溶剂比例为反应时终浓度, 此浓度为添加有机溶剂浓度的一半。

图 4 有机溶剂对酶标孔 OD 值的影响($n=3$)

Fig.4 Effects of organic solvents on the optical density values of microplate wells ($n=3$)



注: DMSO 和 DMF 的溶剂最高比例为 35%, 甲醇和丙酮的溶剂最高比例为 40%。

图 5 有机溶剂对间接竞争 ELISA 法检测 BaP 灵敏度的影响($n=3$)

Fig.5 Effects of organic solvents on the sensitivities of indirect competitive ELISA for the detection of BaP ($n=3$)

2.4 交叉反应性

分别以 60% 甲醇和 60% DMSO 为样品稀释液, 配制不同浓度的 BaP 及其他 PAHs 标准溶液, 利用间接竞争 ELISA 法绘制其竞争抑制曲线。由表 1 可见, 有机溶剂不同, 抗体对 PAHs 的交叉反应性不同。总体上, 以 60% DMSO 作为样品稀释液, 可以降低 BaP 抗体对其他 PAHs

的交叉反应率。对同种样品稀释液来说, 抗体与茚并(1,2,3-cd)芘的交叉反应性最高, 芘次之, 抗体与苯并(e)芘及萘的交叉反应性最弱。根据交叉反应性推断, BaP 中 d-n 键围成的基团与抗体的抗原结合部位空间互补。

表 1 不同有机溶剂体系中抗体 2H10 对 PAHs 化合物的交叉反应率
Table 1 Cross-reactivities of antibody 2H10 to PAHs in different organic solvent systems

化合物	60% 甲醇		60% DMSO	
	IC ₅₀ /(ng/mL)	交叉 反应率/%	IC ₅₀ /(ng/mL)	交叉 反应率/%
BaP	81.4	100	24.5	100
苯并(e)芘	--	--	--	--
芘	122.1	66.7	118.9	20.6
苯并(a)菲	379.6	21.4	608.7	4.0
苯并(a)蒽	314.4	25.9	430.8	5.7
苯并(b)荧蒽	354.7	22.9	137.2	17.9
茚并(1,2,3-cd) 芘	95.7	85.0	46.7	52.4
萘	--	--	--	--

注: -- 表示检测不到有效值。

3 讨论与结论

本研究用 50% 甲醇将 BaP 稀释成一定浓度的工作溶液, 利用间接竞争 ELISA 方法, 筛选获得了 BaP 单克隆抗体。利用竞争 ELISA 法初步鉴定了抗体对 BaP 的检测灵敏度, 抗体符合要求, 可以用于开发 BaP 免疫分析方法。另外, 研究结果表明, 样品稀释液中有有机溶剂种类不同, 抗体对 BaP 结构类似物的交叉反应性不同, 选择合适的样品稀释液, 可以显著降低 BaP 抗体对其他结构类似物的交叉反应率。本研究所得的 BaP 单克隆抗体, 在 ELISA 反应时最大可耐受 50% 的甲醇而不会有活性损失, 这与以前的 BaP 抗体相比, 有机溶剂耐受性明显提高^[19,29]。这也说明在筛选单克隆抗体时, 可以根据最终的应用场景, 合理地设计抗体筛选的条件, 以便能更好地得到所需要的单克隆抗体。

综上, 本研究发现的抗 BaP 单克隆抗体的免疫反应特性, 可以有效指导 BaP 免疫分析方法的开发, 提高分析方法的灵敏度及特异性, 降低开发难度。同时, 本研究制备的抗 BaP 单克隆抗体将来可以应用于 ELISA 试剂盒、免疫层析试纸条、生物传感器等免疫分析平台, 对于实现 BaP 的现场、快速、高灵敏具有积极的意义。

参考文献

[1] BUKOWSKA B, SICIŃSKA P. Influence of benzo(a)pyrene on different epigenetic processes [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13453.
[2] PUNETHA A, SARASWAT S, RAI JPN. An insight on microbial

degradation of benzo[a]pyrene: Current status and advances in research [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2022, 38(4): 61.

- [3] MCCORMICK S, SNAWDER JE, CHEN I, *et al.* Exposure assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in refined coal tar sealant applications [J]. *Int J Hyg Environ Health*, 2022, 242: 113971.
[4] MAO S, LI J, CHENG Z, *et al.* Contribution of biomass burning to ambient particulate polycyclic aromatic hydrocarbons at a regional background site in east China [J]. *Environ Sci Technol Lett*, 2018, 5(2): 56–61.
[5] ALBUQUERQUE M, COUTINHO M, BORREGO C. Long-term monitoring and seasonal analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) measured over a decade in the ambient air of Porto, Portugal [J]. *Sci Total Environ*, 2016, 543(Pt A): 439–448.
[6] YAO Z, LI J, WU B, *et al.* Characteristics of PAHs from deep-frying and frying cooking fumes [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2015, 22(20): 16110–16120.
[7] SAMPAIO GR, GUIZELLINI GM, SILVA SA, *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: Biological effects, legislation, occurrence, analytical methods, and strategies to reduce their formation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 6010.
[8] ZHANG G, PAN Z, WANG X, *et al.* Distribution and accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the food web of Nansi Lake, China [J]. *Environ Monit Assess*, 2015, 187(4): 173.
[9] BUKOWSKA B, MOKRA K, MICHAŁOWICZ J. Benzo[a]pyrene-environmental occurrence, human exposure, and mechanisms of toxicity [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(11): 6348.
[10] XU T, TANG H, CHEN D, *et al.* Simultaneous determination of 24 polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oil by tandem solid-phase extraction and gas chromatography coupled/tandem mass spectrometry [J]. *J Aoac Int*, 2015, 98(2): 529–537.
[11] CONCHIONE C, PURCARO G, CONTE LS, *et al.* Solid-phase microextraction with gas chromatography and mass spectrometry determination of benzo(a)pyrene in microcrystalline waxes used as food additives [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(10): 1749–1754.
[12] 曾楚莹, 曹小云, 吕海燕, 等. 加速溶剂萃取-超高效液相色谱-荧光法测定海产品中苯并(a)芘[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(16): 5730–5735.
ZENG CY, CAO XY, LV HY, *et al.* Determination of benzo(a)pyrene in marine products by accelerated solvent extraction and ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(16): 5730–5735.
[13] 温海滨, 林洁纯, 叶靖怡, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中 20 种苯并咪唑类药物及其代谢物残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(18): 7214–7221.
WEN HB, LIN JC, YE JY, *et al.* Simultaneous determination of 20 kinds of benzimidazoles and their metabolites residues in aquatic products by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(18): 7214–7221.
[14] WANG X, NIESSNER R, TANG D, *et al.* Nanoparticle-based

- immunosensors and immunoassays for aflatoxins [J]. *Anal Chim Acta*, 2016, 912: 10–23.
- [15] 冯敏, 李亚楠, 高丽霞, 等. 酶联免疫吸附法在食品安全性指标检测中的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(10): 3973–3979.
FENG M, LI YN, GAO LX, *et al.* Research progress of enzyme-linked immunosorbent assay in food safety indices detection [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(10): 3973–3979.
- [16] 李向梅, 刘志威, 陈晓敏, 等. 食品安全免疫层析检测技术研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(15): 4939–4955.
LI XM, LIU ZW, CHEN XM, *et al.* Advances of immunochromatography assay for food safety [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(15): 4939–4955.
- [17] BELOGLAZOVA NV, GORYACHEVA IY, MIKHIREV DA, *et al.* New immunochemically-based field test for monitoring benzo[a]pyrene in aqueous samples [J]. *Anal Sci*, 2008, 24(12): 1613–1617.
- [18] 李鑫, 乔琰, 钟国祯. 应用基于单克隆抗体的免疫传感器检测环境中的芘和苯并芘[J]. *环境科学*, 2015, 36(11): 4319–4324.
LI X, QIAO Y, ZHONG GZ. Development of a Monoclonal antibody-based sensor for environmental pyrene and benzo(a)pyrene detection [J]. *Environ Sci*, 2015, 36(11): 4319–4324.
- [19] 陈超超, 邵辉峰, 王吕, 等. 水体中苯并芘检测试剂盒研制及效果评价[J]. *中国公共卫生*, 2016, 32(2): 254–256.
CHEN CC, SHAO HF, WANG L, *et al.* Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay kit for determination of benzo(a)pyrene in water [J]. *Chin J Public Health*, 2016, 32(2): 254–256.
- [20] GELDER S, BAKKE MJ, VOS J, *et al.* The effect of dietary lipid composition on the intestinal uptake and tissue distribution of benzo[a]pyrene and phenanthrene in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2016, 185–186: 65–76.
- [21] 曹梦思, 王君, 张立实, 等. 我国食用油脂中欧盟优控 15+1 种多环芳烃的污染状况分析[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(12): 8.
CAO MS, WANG J, ZHANG LS, *et al.* Analysis of EU 15+1 PAHs pollution in edible fats and oils of China [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2016, 16(12): 8.
- [22] SAMPAIO GR, GUIZELLINI GM, SILVA SA, *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: Biological effects, legislation, occurrence, analytical methods, and strategies to reduce their formation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 6010.
- [23] LIU M, XU M, LOH XJ, *et al.* PEGylated antibody in organic media [J]. *J Biosci Bioeng*, 2011, 111(5): 564–568.
- [24] 何晓婷, 董洁娟, 沈兴, 等. 纳米抗体的稳定性及其结构基础研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2022, 49(6): 1004–1017.
HE XT, DONG JX, SHEN X, *et al.* Advances on the relationship between stability and structure of nanobody [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2022, 49(6): 1004–1017.
- [25] UCHIGASHIMA M, SAIGUSA M, YAMASHITA H, *et al.* Development of a novel immunoaffinity column for aflatoxin analysis using an organic solvent-tolerant monoclonal antibody [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(19): 8728–8734.
- [26] UCHIGASHIMA M, YAMAGUCHI MY, NARITA H, *et al.* Development of an immuno-affinity column for ochratoxin analysis using an organic solvent-tolerant monoclonal antibody [J]. *Methods*, 2012, 56(2): 180–185.
- [27] MARTINI E, TOMASSETTI M, CAMPANELLA L. Determination of traces of several pesticides in sunflower oil using organic phase immunoelectrodes (OPIEs) [J]. *Talanta*, 2015, 132: 503–512.
- [28] MARTINI E, MEROLA G, TOMASSETTI M, *et al.* Agent orange herbicides, organophosphate and triazinic pesticides analysis in olive oil and industrial oil mill waste effluents using new organic phase immunosensors [J]. *Food Chem*, 2015, 169: 358–365.
- [29] PSCHENITZA M, HACKENBERG R, NIESSNER R, *et al.* Analysis of benzo[a]pyrene in vegetable oils using molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) coupled with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Sensors*, 2014, 14(6): 9720–9737.
- [30] DRIBEK M, RINNERT E, COLAS F, *et al.* Organometallic nanoprobe to enhance optical response on the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene immunoassay using SERS technology [J]. *Environ Sci Pollut R*, 2017, 24(35): 27070–27076.
- [31] 孙清, 李谷丰, 邓乾民, 等. 高灵敏黄曲霉毒素 B₁ 酶联免疫试剂盒的研制及应用[J]. *环境化学*, 2015, 34(10): 1845–1853.
SUN Q, LI GF, DENG QM, *et al.* Development and application of a highly sensitive ELISA kit for aflatoxin B₁ [J]. *Environ Chem*, 2015, 34(10): 1845–1853.
- [32] 刘媛媛, 陈奇娜, 徐光辉, 等. 邻苯二甲酸酯类半抗原的设计合成与抗原制备[J]. *精细化工*, 2018, 35(3): 7.
LIU YY, CHEN QN, XU GH, *et al.* Design and synthesis of phthalate ester haptens and antigens [J]. *Fine Chem*, 2018, 25(3): 7.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



孙 清, 博士, 主要研究方向为环境污染物的快速检测, 新型复合纳米材料制备及应用。

E-mail: sunqing@ucas.ac.cn



史亚利, 研究员, 主要研究方向为新型有机污染物分析方法及环境行为研究。

E-mail: shiyali@rcees.ac.cn



时国庆, 副教授, 主要研究方向为环境与食品中污染物的快速免疫检测技术, 体外诊断技术研究。

E-mail: shiguqing@ustb.edu.cn