

## 四溴双酚A类阻燃剂的酶联免疫方法的构建及应用

黄哲, 邵杰, 曾昆, 张旭芸, 陈斌, 杜道林

### 引用本文:

黄哲, 邵杰, 曾昆, 等. 四溴双酚A类阻燃剂的酶联免疫方法的构建及应用[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(6): 1420-1428.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0079>

## 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

### 应用酶联免疫分析方法检测镇江市内水域水样和底泥中的邻苯二甲酸二乙酯

曾昆, 周军, 邵杰, 张祯

农业环境科学学报. 2016, 35(11): 2237-2244 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-0303>

### 杨庄煤矿区农田塌陷水域多介质OCPs污染特征及生态风险研究

周晓芳, 高良敏, 陈晓晴, 查甫更, 王新富

农业环境科学学报. 2020, 39(5): 1085-1093 <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-1397>

### 冬季侧窗通风猪舍氨气和温室气体排放特征

周忠凯, 杨殿林, 张海芳, 赵建宁, 王丽丽, 余刚

农业环境科学学报. 2020, 39(6): 1359-1367 <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-1393>

### 蜀葵-胶质芽孢杆菌联合修复土壤镉污染

赵胤, 龙月, 潘远智, 苟静, 吴騫里, 周蛟, 邬梦晞, 刘柿良

农业环境科学学报. 2020, 39(5): 1026-1033 <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-1310>

### 生物滴滤塔/景观滤床工艺高效处理农村污水

刘梦雪, 曾非凡, 文红平, 林学明, 杨小明, 任宗玲, 李永涛, 张振

农业环境科学学报. 2020, 39(5): 1094-1102 <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-1311>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

黄哲, 邵杰, 曾昆, 等. 四溴双酚A类阻燃剂的酶联免疫方法的构建及应用[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(6): 1420–1428.  
HUANG Zhe, SHAO Jie, ZENG Kun, et al. Construction and application of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of tetra-  
bromobisphenol A[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2020, 39(6): 1420–1428.



开放科学 OSID

## 四溴双酚A类阻燃剂的酶联免疫方法的构建及应用

黄哲<sup>1</sup>, 邵杰<sup>1</sup>, 曾昆<sup>1,2\*</sup>, 张旭芸<sup>1</sup>, 陈斌<sup>1</sup>, 杜道林<sup>1,3\*</sup>

(1. 江苏大学环境与安全工程学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学环境生态研究所, 江苏 镇江 212013; 3. 江苏大学农业工程研究院, 江苏 镇江 212013)

**摘要:**为建立快速、灵敏的检测方法评估四溴双酚A(Tetrabromobisphenol A, TBBPA)类阻燃剂四溴双酚A双(2-羟基乙基)醚(TBBPA-DHEE)在环境中的行为分布,本研究基于TBBPA-DHEE的结构,设计并合成半抗原D<sub>3</sub>;采用杂交瘤技术制备了5株针对TBBPA-DHEE的单克隆抗体;鉴定发现这些抗体均与四溴双酚A单(2-羟基乙基)醚(TBBPA-MHEE)有较高的交叉反应,与其他TBBPAs没有交叉反应;优化抗原/抗体工作浓度、缓冲液条件后,建立了间接竞争ELISA标准曲线。结果显示优化后的ELISA方法检测TBBPA-MHEE的检测范围为0.86~13.70 ng·mL<sup>-1</sup>,检测限(LOD)为0.78 ng·mL<sup>-1</sup>;检测TBBPA-DHEE的检测范围为0.96~8.10 ng·mL<sup>-1</sup>,检测限为0.56 ng·mL<sup>-1</sup>。采集山东省寿光市一家BFR工厂周边的水样和土壤样本,发现TBBPA-DHEE/TBBPA-MHEE在水样中浓度最高可达15.45 ng·mL<sup>-1</sup>,土壤样本中浓度最高可达6.75 ng·g<sup>-1</sup>。

**关键词:** TBBPA; TBBPA-DHEE; TBBPA-MHEE; 单克隆抗体

中图分类号: X830 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2020)06-1420-09 doi:10.11654/jaes.2020-0079

### Construction and application of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of tetrabromobisphenol A

HUANG Zhe<sup>1</sup>, SHAO Jie<sup>1</sup>, ZENG Kun<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Xu-yun<sup>1</sup>, CHEN Bin<sup>1</sup>, DU Dao-lin<sup>1,3\*</sup>

(1. College of Environmental and Safety Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Institute of Environment and Ecology, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 3. Institute of Agricultural Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract:** A rapid and sensitive detection method was established in this study for evaluating the environmental behavior of tetrabromobisphenol A bis(2-hydroxyethyl) ether (TBBPA-DHEE). On the basis of its structure, hapten D<sub>3</sub> was designed and synthesized, and five monoclonal antibodies against TBBPA-DHEE were prepared using hybridoma technology. These antibodies showed high cross-reactivity with tetrabromobisphenol A mono(2-hydroxyethyl) ether (TBBPA-MHEE) and no cross-reactivity with other TBBPAs. After the reaction conditions were optimized, the results showed that the linear ranges of TBBPA-MHEE and TBBPA-DHEE were 0.86~13.70 ng·mL<sup>-1</sup> and 0.96~8.10 ng·mL<sup>-1</sup> with detection limits of 0.78 ng·mL<sup>-1</sup> and 0.56 ng·mL<sup>-1</sup>, respectively. Moreover, in water and soil samples collected near a brominated flame retardants (BFR) plant in Shouguang City, Shandong Province, the maximum concentrations of TBBPA-DHEE/TBBPA-MHEE were 15.45 ng·mL<sup>-1</sup> and 6.75 ng·g<sup>-1</sup>, respectively.

**Keywords:** TBBPA; TBBPA-DHEE; TBBPA-MHEE; monoclonal antibody

收稿日期: 2020-01-17 录用日期: 2020-03-10

作者简介: 黄哲(1994—),女,甘肃天水人,硕士研究生,从事污染物分析研究。E-mail: hz1290573608@163.com

\*通信作者: 曾昆 E-mail: kjj80116@163.com; 杜道林 E-mail: daolindu@163.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(31502118, 21577051)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(31502118, 21577051)

四溴双酚A(Tetrabromobisphenol A, TBBPA)由于极好的阻燃性能成为大量使用的溴代阻燃剂(Brominated flame retardants, BFRs),常见于电子产品、纺织品等生活用品中<sup>[1]</sup>。2001年全球市场总需求达12万吨,2004年约17万吨<sup>[2]</sup>。正是由于TBBPA类阻燃剂的大量应用,导致其在环境样品中广泛检出,在大气<sup>[3-4]</sup>、水体、鱼类<sup>[5-6]</sup>、土壤<sup>[7]</sup>、底泥<sup>[8-9]</sup>、植物<sup>[10]</sup>、鸟蛋<sup>[11]</sup>以及哺乳动物<sup>[12-13]</sup>中均有报道。研究发现TBBPA类化合物是潜在的环境内分泌干扰物,类似于持久性有机污染物,会在环境和生物体内积聚并且具有细胞毒性<sup>[14]</sup>、神经毒性<sup>[15]</sup>、内分泌干扰性<sup>[16]</sup>、免疫毒性<sup>[17]</sup>以及干扰甲状腺激素<sup>[18]</sup>等作用。

四溴双酚A双(2-羟乙基)醚[TBBPA bis(2-hydroxyethyl) ether, TBBPA-DHEE]是主要的TBBPA衍生物之一,在工程聚合物、环氧树脂、热塑性聚酯、聚氨酯等中广泛应用。由于其具有较高的 $\log K_{ow}$ 值,有研究人员认为TBBPA-DHEE具有一定持久性和生物蓄积性,并且具有较高的神经毒性。四溴双酚A单(2-羟乙基)醚[TBBPA mono(2-hydroxyethyl) ether, TBBPA-MHEE]是TBBPAs类化合物及其衍生物在生产过程中的副产物<sup>[19]</sup>。由于结构与TBBPA-DHEE类似,TBBPA-MHEE可能与TBBPA-DHEE具有类似的毒性作用。然而,TBBPA-DHEE/TBBPA-MHEE在环境中累积、转运以及分布的研究较为少见。因此,亟需建立TBBPA-DHEE/TBBPA-MHEE的检测方法,为评估其环境行为提供技术手段。Liu等<sup>[19]</sup>建立了基于ESI-MS用于测定TBBPA-MHEE和TBBPA-DHEE及其他副产物或降解产物。但是TBBPA-DHEE的质子亲和力低,基于ESI或APCI的离子源无法生成足够的特定离子簇用于定量测定,必须通过 $AgNO_3$ 的衍生化,然而高浓度 $AgNO_3$ 的引入可能会增加仪器污染<sup>[20-21]</sup>。Liu等<sup>[22]</sup>应用超高效液相色谱仪-Orbitrap Fusion三重质谱检测TBBPA-MHEE。但是若采用仪器方法,则需要优先获得仪器资源并且需要在测样品前对样本按要求进行处理,且该方法也不能实现一次检测多种样品。以抗原-抗体特异性结合为基础的免疫分析方法,由于其检测手段简单等优势在环境分析领域被大量使用<sup>[21-24]</sup>。然而,应用免疫分析方法检测TBBPA-DHEE/TBBPA-MHEE却鲜有报道。

本研究以阻燃剂TBBPA-DHEE/TBBPA-MHEE为目标物,先通过设计半抗原结构,定期免疫小鼠;之后利用杂交瘤技术筛选出高灵敏度的单克隆抗体,并且对抗体的灵敏度等性质进行了鉴定;建立间接竞争

性ELISA方法用于TBBPA-DHEE/TBBPA-MHEE的检测;采集典型区域的环境样本,分析其中TBBPA-DHEE/TBBPA-MHEE的分布情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

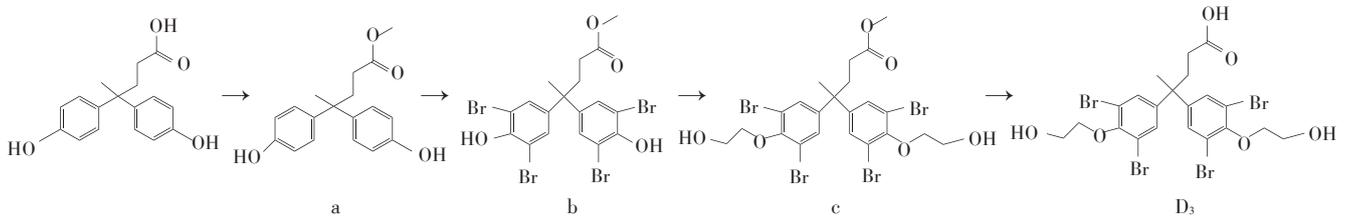
5~6周龄的雌性Balb/C小鼠购自扬州大学兽医学院比较医学中心,SP2/0骨髓瘤细胞购自武汉博士德生物工程有限公司,四溴双酚A单(2-羟基二乙)醚标准品、四溴双酚A双(2-羟基二乙)醚标准品来自中科院生态环境中心,BSA、OVA、EDC·HCl、FCA、FIA、HAT(50×)、HT(50×)、50% PEG、3'-3'-5'-5'-四甲基联苯胺(TMB)购自美国Sigma公司,HRP-IgG购自美国Jacket公司,胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibico公司。其他常规试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。酶标板购于厦门怡佳美公司。多功能酶标仪(TECAN Infinite M1000 PRO)为奥地利TECAN公司生产。

### 1.2 TBBPA-DHEE半抗原的合成与鉴定

称取2.86 g双酚酸装入圆底烧瓶内,加入甲醇20 mL,回流2 h得到2.9 g双酚酸甲酯(a);将双酚酸甲酯溶于40 mL冰醋酸中,然后慢慢加入10 mL含25.7 g液溴的冰醋酸,连续转动5 h;将其倒入亚硫酸氢钠的饱和水溶液,将上述步骤得到的物质通过快速硅胶柱色谱法获得4,4-双(3,5-二溴-4-羟苯基)戊酸甲酯(b);随后利用(b)与2-溴乙醇进行相互作用,得到了化合物4,4-双[3,5-二溴-4-(2-羟基乙氧基)苯基]戊酸甲酯(c);最后再通过化合物(c)与氢氧化钠的相互作用后,即可得到半抗原4,4-双[3,5-二溴-4-(2-羟基乙氧基)苯基]戊酸D<sub>3</sub>。合成路线如图1所示。对合成TBBPA-DHEE的半抗原D<sub>3</sub>用质谱与核磁共振进行结构鉴定。

### 1.3 TBBPA-DHEE人工抗原的合成与鉴定

为了制备完全抗原,本研究采取了碳化二亚胺法将之前合成好的半抗原D<sub>3</sub>与载体蛋白(BSA、OVA)进行偶联。400 mg EDC·HCl和20 mg载体蛋白溶于2 mL PBS(0.01 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7.4)中,在室温下摇匀30 min。取60 mg半抗原D<sub>3</sub>溶于2 mL PBS中,和上述溶液混合均匀,反应4 h,然后在4 °C冰箱条件下反应16 h。随后将其吸出,在PBS溶液(0.01 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7.4)中透析2 d。2 d后剩余在透析袋中的溶液,就是试验需要的完全抗原,其中把BSA-D<sub>3</sub>用作免疫原,把OVA-D<sub>3</sub>用作包被原。将其进行分装后,置于-20 °C

图1 D<sub>3</sub>合成路线Figure 1 The synthetic route of the D<sub>3</sub>

冰箱存放。

人工抗原 BSA-D<sub>3</sub>、OVA-D<sub>3</sub>、BSA、OVA 和 TBB-PA-DHEE, 配制浓度均为 1 mg·mL<sup>-1</sup>, 并用紫外分光光度计进行全波长扫描。

#### 1.4 间接竞争 ELISA 方法的流程

将 OVA-D<sub>3</sub> 通过包被液 (0.05 mol·L<sup>-1</sup> 碳酸盐缓冲液, pH 9.6) 稀释, 以每孔 100 μL 逐孔入酶标板中, 4 °C 条件反应 9 h。甩去包被液, 利用洗涤液进行清洗。之后每孔加入 200 μL 封闭液 (含 1% 明胶的 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS, pH 7.4), 37 °C 培养箱反应 2 h。反应后, 去除封闭液, 拍干。用抗体稀释液 (含 0.1% 明胶的 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS, pH 7.4) 将血清降低浓度, 标准品用 PBS 降低浓度, 将反应浓度的血清和标准品每孔对半各加入, 每个浓度做 3 个平行并设空白对照和阳性对照, 37 °C 反应 2 h。竞争反应后, 用洗涤液清洗, 用吸水纸将板拍干后, 逐孔加入适量浓度的羊抗鼠酶标二抗, 37 °C 孵育 60 min, 随后步骤和之前反应结束后步骤一致。拍干后每孔滴入 100 μL 的 TMB 显色液, 在培养箱内放置 20 min 左右。从培养箱中取出酶标板后滴入 2 mol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 使反应结束进程。最后通过仪器酶标仪来测定其在 450 nm 处的吸光度。

#### 1.5 单克隆抗体的制备与筛选

通过颈背部皮下多处注射的方法将 BSA-D<sub>3</sub> 与 FCA 进行乳化后的乳化物免疫 6~8 周龄 Balb/C 雌性小鼠; 4 周后更换 BSA-D<sub>3</sub> 与 FIA 乳化后的乳化物进行小鼠免疫。第 5 次免疫后, 采用 1.4 的方法对抗血清进行筛查, 选择抗体效价与灵敏度满足要求的小鼠, 取出脾脏细胞, 与骨髓瘤细胞 SP2/0 进行融合, 并进一步克隆并筛选出单克隆细胞。

#### 1.6 单克隆抗体的鉴定

##### 1.6.1 类与亚型的鉴定

采用 Thermo 单克隆抗体亚型鉴定试剂盒对细胞培养液上清进行亚类鉴定。

##### 1.6.2 抗体灵敏度的测定

通过建立的 ELISA 方法模拟出标准曲线, 计算抗

体的半数抑制率 (50% Inhibition of concentration, IC<sub>50</sub>)。其中以不添加标准品 OD 值为 B<sub>0</sub>, 添加不同比例标准品的 OD 值为 B, 将 B 和 B<sub>0</sub> 的比值设为纵坐标, 标准品浓度的对数值设为横坐标。

#### 1.6.3 抗体交叉反应率测定

选取结构类似物进行交叉反应测定, 测定其特异性。公式为: 交叉反应率 (CR%) = IC<sub>50</sub>(待检测标准片浓度) / IC<sub>50</sub>(其他衍生物浓度) × 100%。

#### 1.7 ELISA 方法建立

##### 1.7.1 抗体和包被原用于反应的最佳浓度

采用棋盘法确定抗原-抗体结合浓度。包被不同浓度的 OVA-D<sub>3</sub> (1:1 000 倍比稀释到 1:32 000), 不同浓度的抗体 (1:20 倍比稀释到 1:2 560), 其他流程同 1.4。采用酶标仪确定其在 450 nm 的 OD 值, 并选取 OD 值在 1.0 左右的包被原和抗体稀释浓度作为优化后的反应浓度。

##### 1.7.2 确定最优 pH 值

按 1.7.1 确定的结果进行前面的步骤, 之后利用不同 pH 值的缓冲溶液稀释标准品, pH 分别为 4.0、5.0、7.4、8.0 和 10.0, 之后步骤不变, 测定 450 nm 处的吸光度, 确定 pH 值。

##### 1.7.3 确定最优蛋白浓度

标准品用不同蛋白质浓度 (0、0.10%、0.50%、1%、5%、10%) 的缓冲液降低浓度, 完成 ELISA 反应, 确定蛋白质浓度。

##### 1.7.4 确定最优离子强度值

利用不同离子强度 (0、0.01、0.05、0.1、0.2 mol·L<sup>-1</sup>) 缓冲液降低标准品浓度, ELISA 反应后, 确定离子强度。

##### 1.7.5 确定有机溶液浓度

用不同浓度的甲醇 (分别为 0、5%、10%、20%、30%、50%) 缓冲液降低标准品浓度, ELISA 反应后, 通过 450 nm 处的吸光度, 选择甲醇浓度。

##### 1.7.6 标准曲线的建立

基于上述优化条件, 按照 1.4 中的操作流程, 建立

标准曲线,每个平行设置2组重复。用四参数方程拟合标准曲线,按照下式计算检测限(Limit of detection, LOD)、半数抑制率(IC<sub>50</sub>)及检测范围(IC<sub>20</sub>~IC<sub>80</sub>)。

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{X}{X_0}\right)^P}$$

式中: $y$ 为吸光度的比值 $A/A_0$ ;  $X$ 为已知的标准品浓度,  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $A_1$ 为拟合成功曲线的上渐近线斜率;  $A_2$ 为拟合成功曲线的下渐近线斜率;  $X_0$ 即为IC<sub>50</sub>的值,  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $P$ 是IC<sub>50</sub>处点的斜率。

### 1.8 典型环境样品的采集、前处理及检测

山东省寿光市是我国主要的BFRs生产地,当地有多家TBBPA及其衍生物生产工厂。于2016年10月对山东省寿光市溴代阻燃剂加工基地附近水样和土样进行收集,分装并保存在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下。

水样的前处理方法:用10 mL注射器吸取水样,并使用0.22  $\mu\text{m}$ 硝酸纤维素膜进行过滤,滤液直接用于检测。

土壤样本的前处理方法:将样本冻存干燥后,使用研钵打碎研磨至粉状;在加速溶剂萃取(Accelerated solvent extraction, ASE)反应釜中加入一半量的硅藻土,称取1 g土壤样本加入反应釜中用玻璃棒轻轻搅匀,使得土样样本与硅藻土充分混匀后,用硅藻土将反应釜填满,上机待测;加入萃取剂,萃取样本中待检测物;收集萃取液,旋转蒸发,保留5 mL左右;将剩余的萃取剂用氮气吹干,然后用含有一定浓度的甲醇进行复溶,用于检测。

参考Tian等<sup>[25]</sup>的方法采用ESI-MS方法对样本中的TBBPA-DHEE/TBBPA-MHEE进行检测。其中针对TBBPA-DHEE的最低检测限LOD为 $0.49\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , TBBPA-MHEE的LOD为 $0.33\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 TBBPA-DHEE半抗原的鉴定

由于TBBPA-DHEE属于小分子物质,不具备免疫原性,需要与大分子载体蛋白偶联获得完全抗原。然而,TBBPA-DHEE结构中没有活性基团,无法直接偶联,需要衍生化;同时需要考虑暴露适当结构,作为抗原识别表位<sup>[26-28]</sup>。根据目标物质的分子结构,采用两种策略:(1)从苯环侧链的羟基衍生,以两个苯环及其侧链作为表位;(2)从两个苯环中间的支链进行衍生,以一侧的苯环及其侧链作为表位。前期本课题组采用前一种策略合成了半抗原M<sub>3</sub>,免疫家兔制备了

TBBPA-DHEE多克隆抗体,并建立了竞争性ELISA方法,其IC<sub>50</sub>为 $9.868\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ <sup>[26]</sup>。在本研究中,通过苯环中间的支链衍生出羧基,获得半抗原D<sub>3</sub>。对TBBPA-DHEE的半抗原D<sub>3</sub>用核磁共振氢谱和质谱分析法进行鉴定。质谱结果如图2所示,核磁共振氢谱结果如图3所示,根据对特征峰形的研究、化合物官能团中氢原子数量种类的分析以及对化学位移的分析,结果表明反应产物为目标化合物,即TBBPA-DHEE半抗原D<sub>3</sub>。

### 2.2 TBBPA-DHEE人工抗原的鉴定

通过紫外扫描全光谱的方法按照吸收峰位置的变化,可以判断出半抗原与载体蛋白的偶联情况。如图4为BSA-D<sub>3</sub>、OVA-D<sub>3</sub>等物质的紫外吸收光谱图。半抗原、载体蛋白和结合物的紫外吸收光谱发生了显著变化,结合物的峰位发生了位移,说明免疫原偶联是成功的。

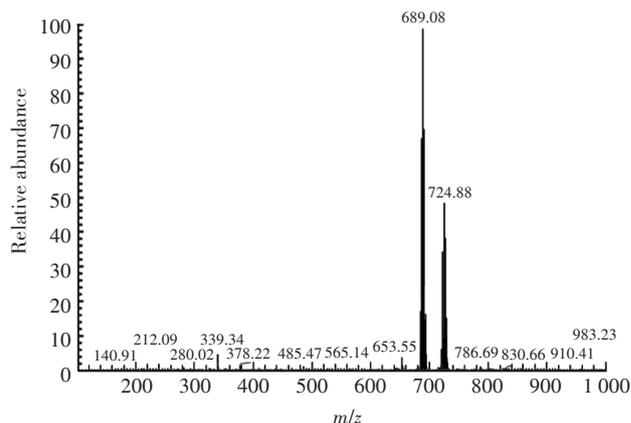


图2 半抗原D<sub>3</sub>的电喷雾质谱图

Figure 2 ESI-MS spectrogram for hapten D<sub>3</sub>

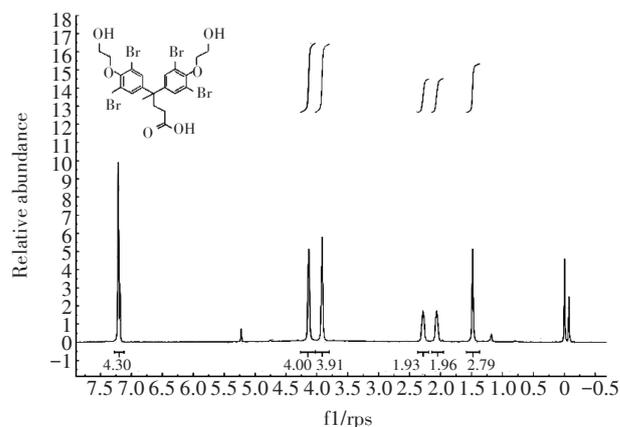


图3 半抗原D<sub>3</sub>的核磁共振氢谱图

Figure 3 <sup>1</sup>H-NMR spectrogram for hapten D<sub>3</sub>

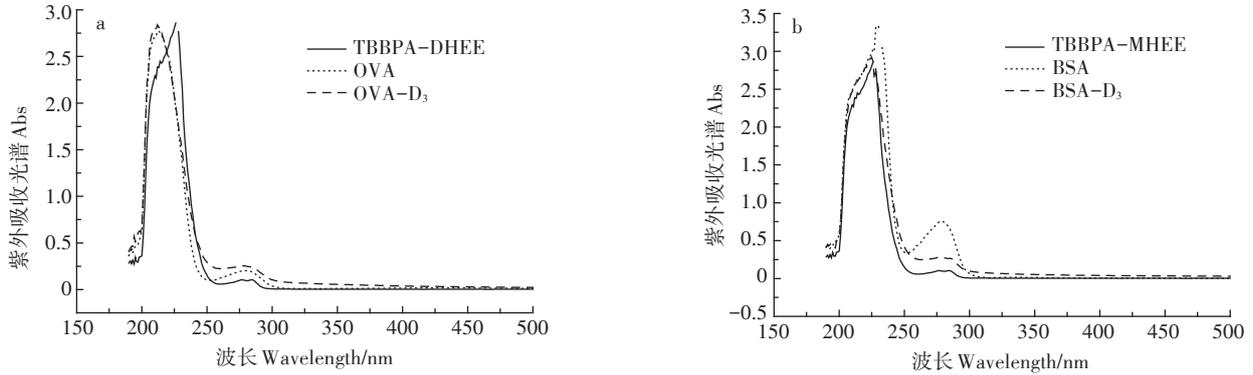


图4 OVA、BSA及偶联物的紫外吸收光谱

Figure 4 UV absorption spectrogram of the D<sub>3</sub> and conjugate

### 2.3 单克隆抗体制备与鉴定

用ELISA方法对免疫后的抗血清进行效筛选,结果见表1,其中抗血清以1:2 000用抗体稀释液稀释。可以看出1、2、3号小鼠血清的效价较高,同时比较其在0.250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时抑制率,发现1号小鼠的抑制率最高(75.9%)。因此,最终选择1号Balb/C小鼠进行后面细胞融合试验。

经过多次克隆培养后,获得5株能够稳定分泌TBBPA-DHEE单克隆抗体的杂交瘤细胞株,标记为E<sub>2</sub>D<sub>2</sub>、D<sub>2</sub>D<sub>4</sub>、C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>、D<sub>4</sub>G<sub>6</sub>、F<sub>7</sub>D<sub>5</sub>。经亚型鉴定试剂盒测定,5株单克隆抗体均为IgG1型、Kappa链。

同时对5株单克隆抗体的特异性进行了鉴定(表2)。结果显示,这5株单克隆抗体与TBBPA、TBBPA-DAE、TBBPA-DBPE、TBBPA-MHPE、TBBPA-MBPE、TBBPA-MAE没有交叉反应,而与TBBPA-MHEE均有不同程度的交叉反应(55.32%~83.32%)。根据TBBPA-DHEE和TBBPA-MHEE的结构,可以看出,二者结构具有较高的相似性,仅在侧链有所不同。因此所得抗体能够同时识别这两种物质。鉴于D<sub>4</sub>G<sub>6</sub>株抗体与TBBPA-MHEE有较高的交叉反应,因此后续试验中用其构建同时检测TBBPA-DHEE与TBBPA-MHEE的免疫分析方法。

### 2.4 ELISA条件优化结果

首先采用棋盘法确定抗原-抗体最佳反应浓度,结果见表3。选择吸光度在1.2前后且相邻浓度结果下吸光度区分较为明显的位点,由此确定的浓度为包被原1:640,抗体1:4 000。

在ELISA反应体系中,抗原抗体的结合通过非共价键的结合作用,体系处于动态平衡中,故反应缓冲液对整个体系起着至关重要的作用。在反应过程中,溶液的成分、pH以及有机溶剂均能够影响检测方法的灵敏度。本研究选择IC<sub>50</sub>和OD<sub>max</sub>两个指标来判断最佳条件,通常认为最优条件下IC<sub>50</sub>越低而OD<sub>max</sub>越高。试验结果整合于图5。从试验结果来看,随着pH的增加,IC<sub>50</sub>和OD<sub>max</sub>均呈现先升高后降低的态势,其中当pH为10时,IC<sub>50</sub>最小,而pH为7.4时,OD<sub>max</sub>最大。综合两个指标的结果,选用pH 7.4作为优化参数。从图中可以看出,溶液中含有适量的蛋白(0.5% BSA)有助于提升方法的灵敏度。缓冲液中Na<sup>+</sup>离子强度升高会导致OD<sub>max</sub>的降低,同时使得IC<sub>50</sub>先降低后升高。最终选择0.01 mol·L<sup>-1</sup> Na<sup>+</sup>作为最佳浓度。由于TBBPA-DHEE和TBBPA-MHEE脂溶性较强,因此需要有机溶剂进行助溶<sup>[29]</sup>,本研究选择常用的甲醇作为助溶剂进行评估。伴着缓冲液中甲醇含量的增加,OD<sub>max</sub>

表1 抗血清的筛选

Table 1 Screening of antiserum

包被浓度 Antigen concentration/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	标准品浓度 Standard concentration/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Balb/C小鼠编号 Number of mice				
		1	2	3	4	5
0.2	0	1.124 1	1.019 6	1.097 8	0.989 6	0.849 8
	0.050	0.630 2	0.759 8	0.639 8	0.530 9	0.549 0
	0.125	0.330 1	0.490 1	0.359 4	0.329 1	0.290 2
	0.250	0.270 9	0.409 1	0.350 9	0.314 9	0.242 8

表2 单克隆抗体的交叉反应率(%)

Table 2 Cross-reactivity of monoclonal antibodies(%)

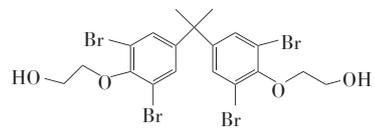
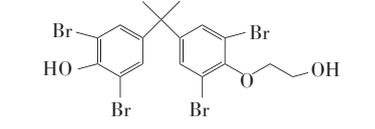
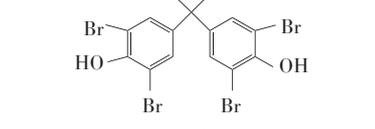
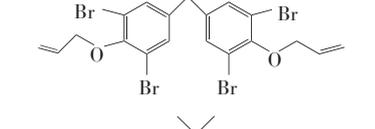
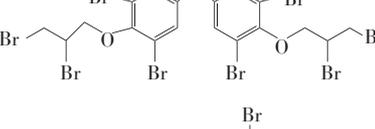
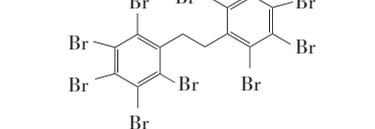
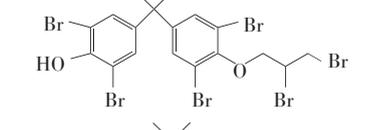
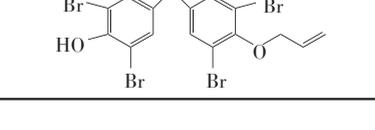
化合物 Compound	E <sub>2</sub> D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub> D <sub>4</sub>	C <sub>2</sub> D <sub>6</sub>	D <sub>4</sub> G <sub>6</sub>	F <sub>7</sub> D <sub>5</sub>	
	TBBPA-DHEE	100	100	100	100	100
	TBBPA-MHEE	55.32	64.23	53.55	83.32	71.78
	TBBPA	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
	TBBPA-DAE	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
	TBBPA-DBPE	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
	TBBPA-DBDPE	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
	TBBPA-MBPE	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
	TBBPA-MAE	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表3 棋盘法选择包被原及抗体反应稀释比例

Table 3 Dilution rate of coating antigen and antibody by checkerboard method

Ag	Ab					
	1:1 000	1:2 000	1:4 000	1:8 000	1:16 000	1:32 000
1:20	3.169 9	3.093 2	2.845 3	2.632 4	2.356 8	2.019 8
1:40	2.801 2	2.599 8	2.543 0	2.356 2	2.019 3	1.590 3
1:80	2.659 8	2.501 2	2.309 3	2.109 9	1.760 9	1.129 8
1:160	2.401 2	2.149 0	2.290 1	1.863 2	1.341 2	0.853 1
1:320	2.209 1	1.910 2	1.691 8	1.450 1	0.983 4	0.530 1
1:640	1.654 8	1.501 2	1.240 1	1.001 2	0.569 1	0.369 8
1:1 280	1.113 4	0.951 8	0.749 8	0.610 1	0.359 8	0.251 0
1:2 560	0.821 8	0.521 8	0.445 0	0.401 2	0.245 1	0.169 1

呈先减小后增加再减小的趋势。故选择甲醇含量为30%作为优化条件。

### 2.5 同时检测 TBBPA-DHEE 和 TBBPA-MHEE 标准曲线的建立

在上述 ELISA 的优化条件下,基于 D<sub>4</sub>G<sub>6</sub> 株单克隆抗体,按照梯度分别稀释 TBBPA-MHEE 的标准品浓度(CK、0、0.1、1、3、10、30、100、1 000 ng·mL<sup>-1</sup>)和 TBBPA-DHEE 的标准品浓度(CK、0、0.312 5、0.625、1.25、2.5、5、10、20 ng·mL<sup>-1</sup>)做标准曲线,每组 4 个平行。建立 TBBPA-MHEE 与 TBBPA-DHEE 的竞争 ELISA 标准曲线(图 6)。该方法检测出 TBBPA-MHEE 的 IC<sub>50</sub>

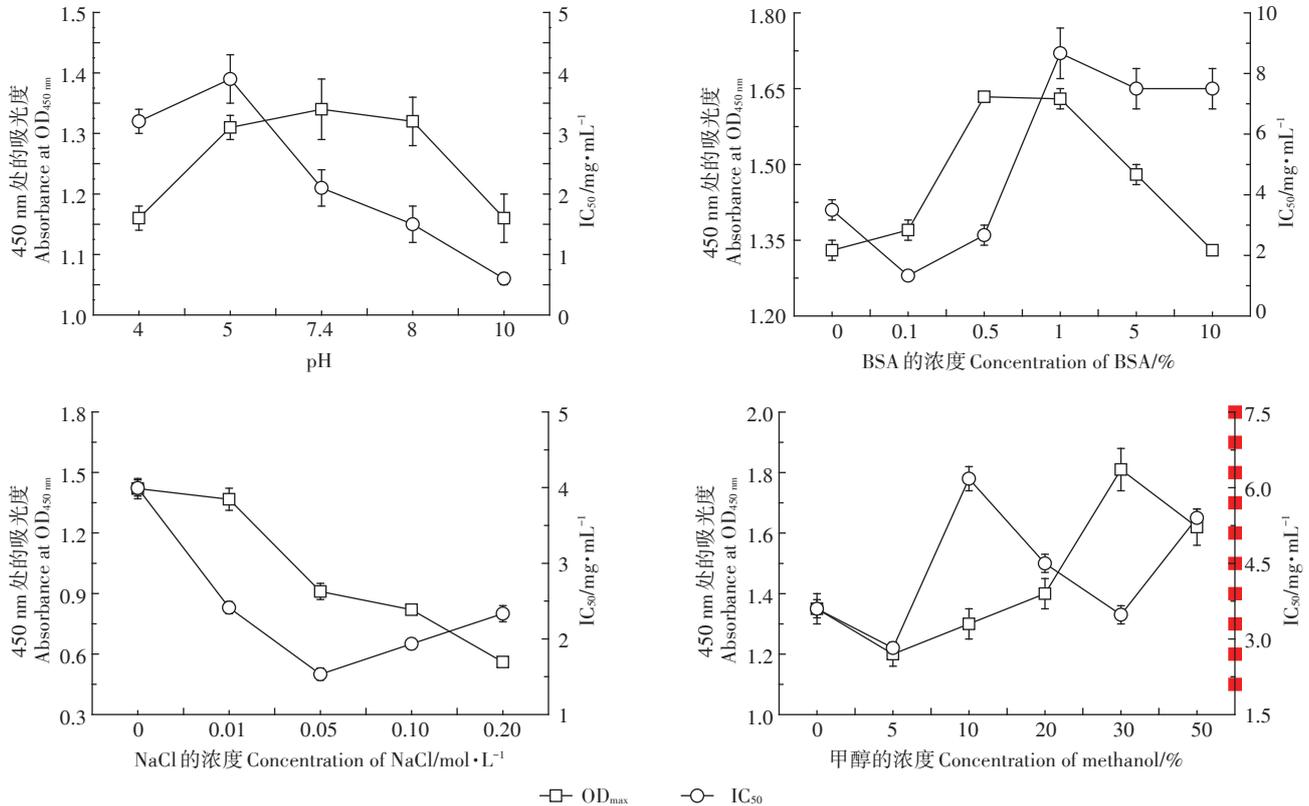


图5 不同缓冲液条件下的OD<sub>max</sub>和IC<sub>50</sub>值

Figure 5 OD<sub>max</sub> and IC<sub>50</sub> value of ELISA in various buffer conditions

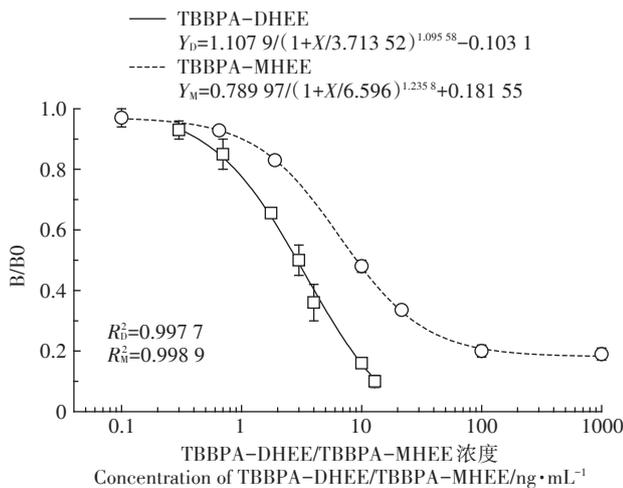


图6 同时检测TBBPA-DHEE和TBBPA-MHEE的ELISA标准曲线

Figure 6 Calibration curve for TBBPA-DHEE and TBBPA-MHEE by ELISA

为  $3.51 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 线性范围是  $0.86 \sim 13.7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , LOD 为  $0.78 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $R^2 \geq 0.99$ . 检测 TBBPA-DHEE 的  $\text{IC}_{50}$  为  $2.76 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 线性范围在  $0.96 \sim 8.098 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , LOD 为  $0.56 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $R^2 \geq 0.99$ .

## 2.6 典型区域环境样本中的 TBBPA-DHEE 和 TBBPA-MHEE

由于 TBBPAs 的广泛应用, 在多种环境样本中均有检出报道, 然而对于 TBBPA-DHEE/TBBPA-MHEE 在环境中分布情况报道较少. 仅有 Liu 等<sup>[30]</sup> 在山东省一家 BFR 厂家周围的土壤样本中检测到 TBBPA-MHEE, 浓度在  $\text{ND} \sim 13.7 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$ ; Zhang 等<sup>[26]</sup> 在镇江市区域内采集了池塘水、自来水、湖水、河水和稻田水, 并应用 ELISA 方法对环境水样进行了检测, 发现 TBBPA-DHEE/TBBPA-MHEE 的含量在  $1.5 \sim 7.7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

山东省寿光市是我国主要的 BFRs 生产地, 当地有多家 TBBPA 及其衍生物生产工厂. 于 2016 年 8 月对山东省寿光市某生产 BFRs 工业区域周边环境采样, 对样本采用 1.8 中提到的处理流程及方法, 并应用建立的 ELISA 方法检测样本中 TBBPA-DHEE 和 TBBPA-MHEE. 在表 4 中发现 TBBPA-DHEE/TBBPA-MHEE 在水样中检出率为 80%, 检出浓度在  $1.759 \sim 15.45 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 土壤样本中检出率为 100%, 检出浓度在  $1.12 \sim 6.75 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ . 同时, 采用 ESI-MS 对采

表4 环境样本中TBBPA-DHEE和TBBPA-MHEE浓度

Table 4 Occurrence of TBBPA-DHEE and TBBPA-MHEE in samples

采样点 Sites	ELISA		ESI-MS			
	TBBPA-DHEE/TBBPA-MHEE		TBBPA-DHEE		TBBPA-MHEE	
	水样 Waters/ng·mL <sup>-1</sup>	土壤样本 Sediments/ng·g <sup>-1</sup>	水样 Waters/ng·mL <sup>-1</sup>	土壤样本 Sediments/ng·g <sup>-1</sup>	水样 Waters/ng·mL <sup>-1</sup>	土壤样本 Sediments/ng·g <sup>-1</sup>
X1	1.759	1.12	0.832	1.343	0.181	ND
X2	2.445	2.96	1.363	2.098	0.567	1.34
X3	15.45	6.75	14.97	4.67	0.331	2.13
SS	ND	1.54	ND	1.234	ND	ND
F	1.857	3.09	2.052	2.672	ND	0.458

注: ND 表示未检出。

Note: ND means not detected.

集的样本进行了检测,结果与ELISA具有较好的一致性。但是,由于所获得的抗体对TBBPA-DHEE和TBBPA-MHEE均有较好的识别能力,因此建立的ELISA方法检测的是TBBPA-DHEE和TBBPA-MHEE的总量。在后续试验中,筛选特异性识别这两种靶物质的抗体,建立特异性的检测方法,则是本研究重点。

### 3 结论

(1)设计并合成制备TBBPA-DHEE半抗原D<sub>3</sub>,并将D<sub>3</sub>与载体蛋白BSA、OVA偶联结合;免疫小鼠并筛选血清后,采用杂交瘤技术制备抗TBBPA-DHEE单克隆抗体5株,经鉴定这5株抗体均能同时识别TBBPA-MHEE和TBBPA-DHEE,并与其他TBBPA类似物没有交叉反应;基于单克隆抗体D<sub>4</sub>G<sub>6</sub>,建立了ELISA方法,优化条件后,其针对TBBPA-DHEE的IC<sub>50</sub>和LOD分别为2.76 ng·mL<sup>-1</sup>和0.56 ng·mL<sup>-1</sup>,针对TBBPA-MHEE的IC<sub>50</sub>和LOD分别为3.51 ng·mL<sup>-1</sup>和0.78 ng·mL<sup>-1</sup>。

(2)以建立的ELISA方法检测了山东省寿光市一家BFR工厂周边的水样和土壤样本,发现TBBPA-DHEE/TBBPA-MHEE在水样中检出浓度在1.759~15.45 ng·mL<sup>-1</sup>,土壤样本中检出浓度在1.12~6.75 ng·g<sup>-1</sup>。酶联免疫分析方法的建立为环境中污染物的分布调查,继而进行风险评估提供了有效的技术手段。

#### 参考文献:

- [1] 王 旭. 新兴污染物溴代阻燃剂的环境问题[J]. 中国科技信息, 2011(12):38.  
WANG Xu. Environmental problems of brominated flame retardants[J]. *China Science and Technology Information*, 2011(12):38.
- [2] Mäkinen M S E, Mäkinen M R A, Koistinen J T B, et al. Respiratory and dermal exposure to organophosphorus flame retardants and tetrabromobisphenol A at five work environments[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(3):941-947.
- [3] Takigami H, Suzuki G, Hirai Y, et al. Brominated flame retardants and other polyhalogenated compounds in indoor air and dust from two houses in Japan[J]. *Chemosphere*, 2009, 76:270-277.
- [4] Ni H G, Zeng H. HBCD and TBBPA in particulate phase of indoor air in Shenzhen, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2013, 458-460:15-19.
- [5] 赵明东, 杨苏文, 李和平, 等. 洱海表层沉积物与鱼体中四溴双酚A的环境暴露水平[J]. 环境科学研究, 2013, 26(2):160-165.  
ZHAO Ming-dong, YANG Su-wen, LI He-ping, et al. Determination of tetrabromobisphenol A exposed in surface sediment and fishes from Erhai Lake[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2013, 26(2):160-165.
- [6] Harrad S, Abdallah M A E, Rose N L, et al. Current-use brominated flame retardants in water, sediment, and fish from English lakes[J]. *Environmental Science and Technology*, 2009, 43(24):9077-9083.
- [7] Wang J X, Liu L L, Wang J F, et al. Distribution of metals and brominated flame retardants (BFRs) in sediments, soils and plants from an informal E-waste dismantling site, South China[J]. *Environmental Science Pollution Research*, 2015(22):1020-1033.
- [8] Zhang X L, Luo X J, Chen S J, et al. Analysis of free and bound residues of polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A in sediment[J]. *Chinese Journal of analytical Chemistry*, 2009, 37(11):1577-1582.
- [9] Feng A H, Chen S J, Chen M Y, et al. Hexabromocyclododecane (HBCD) and tetrabromobisphenol A (TBBPA) in riverine and estuarine sediments of the Pearl River Delta in southern China, with emphasis on spatial variability in diastereoisomer- and enantiomer- specific distribution of HBCD[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2012(64):919-925.
- [10] Li Y N, Zhou Q X, Wang Y Y, et al. Fate of tetrabromobisphenol A and hexabromocyclododecane brominated flame retardants in soil and uptake by plants[J]. *Chemosphere*, 2011, 82:204-209.
- [11] Vorkamp K, Thomsen M, Falk K, et al. Temporal development of brominated flame retardants in peregrine falcon (*Falco peregrinus*) eggs

- from South Greenland (1986—2003) [J]. *Environmental Science and Technology*, 2005, 39(21):8199–8206.
- [12] Jakobsson K, Thuresson K, Rylander L, et al. Exposure to polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A among computer technicians[J]. *Chemosphere*, 2002, 46:709–716.
- [13] Cariou R, Antignac J P, Zalko D, et al. Exposure assessment of French women and their newborns to tetrabromobisphenol-A: Occurrence measurements in maternal adipose tissue, serum, breast milk and cord serum[J]. *Chemosphere*, 2008, 73:1036–1041.
- [14] Zieminska E, Lenart J, Jerzy W, et al. Select putative neurodevelopmental toxins modify SNAP-25 expression in primary cultures of rat cerebellar granule cells[J]. *Toxicology*, 2016, 370:86–93.
- [15] Pullen S, Boecker R, Tiegs G, et al. The flame retardants terabromobisphenol A and terabromobisphenol A-bisallulether suppress the induction of interleukin-2 receptor alpha chain(CD25) in murine splenocytes[J]. *Toxicology*, 2003, 184(1):11–22.
- [16] 高丹丹, 于云江, 王 琼, 等. 不同暴露方式四溴双酚 A 的代谢及毒性特征[J]. *环境与健康*, 2015, 32(2):165–168.  
GAO Dan-dan, YU Yun-jiang, WANG Qiong, et al. Researches on toxicology and metabolic characteristics of tetrabromobisphenol A under different exposure ways[J]. *Journal of Environmental Health*, 2015, 32(2):165–168.
- [17] 杨苏文, 王圣瑞, 闫振广, 等. 四溴双酚 A 在 5 种巢湖鱼类体内的组织分布与生物浓缩因子研究[J]. *环境科学*, 2012, 33(6):1853–1857.  
YANG Su-wen, WANG Shen-rui, YAN Zhen-guang, et al. Tissue distribution and bioconcentration factors of tetrabromobisphenol A in five fishes in lake Chaohu[J]. *Environmental Science*, 2012, 33(6):1853–1857.
- [18] Fini J B, Riu A, Debrauwer L, et al. Parallel biotransformation of tetrabromobisphenol A in xenopus laevis and mammals: Xenopus as a model for endocrine perturbation studies[J]. *Toxicological Sciences*, 2012, 125(2):359–367.
- [19] Liu Q, Ren X M, Long Y M, et al. The potential neurotoxicity of emerging tetrabromobisphenol A derivatives based on rat pheochromocytoma cells[J]. *Chemosphere*, 2016, 154:194–203.
- [20] Tian Y, Chen J, Ouyang Y Z, et al. Reactive extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry for sensitive detection of tetrabromobisphenol A derivatives[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2014, 814:49–54.
- [21] Tian Y, Liu A F, Qu G B, et al. Silver ion post-column derivatization electrospray ionization mass spectrometry for determination of tetrabromobisphenol A derivatives in water samples[J]. *The Royal Society of Chemistry*, 2015, 5:17474–17481.
- [22] Liu A F, Qu G B, Zhang C L, et al. Identification of two novel brominated contaminants in water samples by ultra-high performance liquid chromatography-Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer[J]. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1377:92–99.
- [23] Li Y S, Meng X Y, Zhou Y, et al. Magnetic bead and gold nanoparticle probes based immunoassay for  $\beta$ -casein detection in bovine milk samples[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 66:559–564.
- [24] Liu L H, Liu A F, Zhang Q H, et al. Determination of tetrabromobisphenol-A/S and their main derivatives in water samples by high performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1497:81–86.
- [25] Tian Y, Liu A F, Qu G B, et al. Silver ion post-column derivatization electrospray ionization mass spectrometry for determination of tetrabromobisphenol A derivatives in water samples[J]. *The Royal Society of Chemistry*, 2015 5(23):17474–17481.
- [26] Zhang Z, Zhu N F, Huang M L, et al. Sensitive immunoassay for simultaneous determination of tetrabromobisphenol A bis (2-hydroxyethyl) ether and tetrabromobisphenol A mono (hydroxyethyl) ether: An effective and reliable strategy to estimate the typical tetrabromobisphenol A derivative and byproduct in aquatic environments[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 229:431–438.
- [27] Wang J, Candace R S B, Majkova Z, et al. Heterologous antigen selection of camelid heavy chain single domain antibodies against tetrabromobisphenol A[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86:8296–8302.
- [28] Xu T, Wang J, Liu S Z, et al. A highly sensitive and selective immunoassay for the detection of tetrabromobisphenol A in soil and sediment [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 751:119–127.
- [29] Vasylieva N, Ahn K C, Barnych B, et al. Development of an immunoassay for the detection of the Phenylpyrazole insecticide fipronil[J]. *Environmental Science and Technology*, 2015, 49:10038–10047.
- [30] Liu A F, Shi J B, Qu G B, et al. Identification of emerging brominated chemicals as the transformation products of tetrabromobisphenol A (TBBPA) derivatives in soil[J]. *Environmental Science and Technology*, 2017, 51:5434–5444.