

双酚 A 快速检测胶体金试纸的研制

吴盼盼¹, 李月明¹, 张俊¹, 周丽华¹, 张焜¹, 赵肃清¹, 赵凤仪²

(1. 广东工业大学轻工化工学院, 制药工程系, 广东广州 510006) (2. 广州市第二中学, 广东广州 510530)

摘要: 为建立一种快速检测双酚A (BPA) 的方法, 本论文建立以胶体金为基础的免疫层析法 (GICA)。首先通过BPA人工抗原免疫Balb/c小鼠, 然后利用正常的杂交瘤技术制备BPA的单克隆抗体, 所制备的抗体经过辛酸-硫酸铵 (CA-AS) 沉淀法纯化后并鉴定为IgG2b亚型。胶体金是由柠檬酸三钠还原氯金酸而制得, 通过紫外扫描光谱和透射电镜检测, 结果表明胶体金在530 nm有单一吸收峰、粒径约为30 nm。用其标记BPA单克隆抗体, 制备金标抗体。本研究所制备的胶体金免疫层析试纸条的检测限为100 ng/mL, 检测时间为10 min, 交叉反应表明, 试纸条和BPA的结构类似物双酚酸、任基酚和辛基酚无交叉反应, 有良好的再现性。该方法能够方便、快捷、有效的检测环境中的BPA, 免疫层析试纸的研制为BPA进行现场快速的检测奠定了基础。

关键词: 双酚 A; 单克隆抗体; 胶体金; 免疫层析; 试纸

文章编号: 1673-9078(2014)6-276-280

Development of a Colloidal Gold Labeled Strip for the Rapid Detection of Bisphenol A

WU Pan-pan¹, LI Yue-ming¹, ZHANG Jun¹, ZHOU Li-hua¹, ZHANG Kun¹, ZHAO Su-qing¹, ZHAO Feng-yi²

(1. Department of Pharmacy Engineering, Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China) (2. The Second Middle School in Guangzhou City, Guangzhou 510530, China)

Abstract: To establish a rapid method for detection of Bisphenol A (BPA), colloidal gold-based immune chromatographic assay (GICA) was used. After using artificial antigen of BPA to immune Balb/C mice, monoclonal antibodies against BPA were prepared by normal hybridoma technology. The monoclonal antibody was purified by precipitation of Caprylic Acid-Ammonium Sulfate (CA-AS) and it was identified as IgG2b subtypes. Colloidal gold was prepared through the reduction of gold chloride by sodium citrate acid. UV-Vis spectrum and transmission electron microscope (TEM) were performed, the results indicated that the colloidal gold had a single 530 nm absorption peak and its particle size was about 30 nm. The colloidal gold-antibody was produced by monoclonal antibody of BPA labeled with colloidal gold. In this study, the GICA sensitivity was about 100 ng/mL and the detection time was about 10 min. The cross-reactions showed that there was no cross-reaction between test strip and BPA analogues, but had good reproducibility. This method was convenient, rapid and effective for detecting BPA, and the development of GICA was applicable for the rapid determination of BPA in the field.

Key words: bisphenol A; monoclonal antibody; colloidal gold; immunochromatographic assay; test strip

双酚 A (BPA) 又名 2, 2-双 (4-羟基苯基) 丙烷, 分子式为 $C_{15}H_{16}O_2$ 。BPA 是通过苯酚和丙酮在酸性条件缩合制得。BPA 作为重要的化工原料之一, 主要用于生产聚碳酸酯、不饱和聚酯树脂、环氧树脂聚苯醚树脂等高分子材料^[1]。而这些高分子材料在饮料瓶、玩具、婴儿用品等生活用品的生产制造中得到广泛的应用^[2]。

近年来, 由 BPA 引起的不良事故, 如“含 BPA 的婴儿奶瓶”等事件已经得到广泛的关注。我国从 2011

年 6 月 1 日起已禁止生产聚碳酸酯婴幼儿奶瓶和其他含 BPA 的婴幼儿奶瓶, 9 月 1 日起, 禁止进口和销售聚碳酸酯婴幼儿奶瓶和其他含 BPA 的婴幼儿奶瓶。目前, 包括欧盟、美国、加拿大、澳大利亚和新西兰等数十个国家, 都颁布了 BPA 限制法案。但 BPA 在工业生产过程中可能会因溶出、迁移、排放等原因进入环境, 仍广泛的潜伏于人们的生活和环境中。BPA 是在环境中发现的一种异雌激素^[3], 大量研究表明, BPA 具有生物毒性和内分泌干扰作用, 可造成人体内分泌系统紊乱^[4], BPA 还会影响胚胎的发育, 导致早熟、流产等现象的发生^[5-6], 还可能会增加男性不育症, 乳腺癌, 前列腺癌的发病率^[7-8], 此外, BPA 与糖尿病, 肥胖, 肝功能异常等疾病也有重要关系^[9-10]。因此,

收稿日期: 2014-01-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (41071176; 41271340)

作者简介: 吴盼盼 (1987-), 男, 研究生, 研究方向为药物化学

通讯作者: 赵肃清 (1969-), 男, 教授, 博导, 研究方向为免疫分析

为有效的控制 BPA 对环境和人类健康的危害,人们期望找到一个 BPA 的快速检测方法。

目前国内外监测 BPA 的方法主要有紫外分光光度法 (UV)、气相色谱法 (GC)、高效液相色谱法 (HPLC)、荧光光谱法、质谱联用法、免疫分析法等物理或化学方法^[1]。物理方法中紫外分光光度法检测 BPA 的灵敏度不够高,气相色谱法和高效液相色谱法检测 BPA 的灵敏度和精确性较好,但样品的前处理过程较复杂,操作费时,而且分析成本昂贵,还需要专业的技术人员。而基于抗原抗体特异性反应的化学方法,即免疫分析方法操作快速简单、经济且具有较高的灵敏度,符合现场环境样品痕量污染物检测的需求,免疫分析法已成为研究的热点。

本文旨在开发胶体金免疫层析试纸,实现 BPA 的快速检测,具备灵敏度高、操作简便等特点,便于现场快速检测。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

双酚 A (BPA) 标准品,购于阿拉丁试剂公司; BPA-OVA 包被抗原,为本实验室自制; BPA 单克隆抗体,来源于本实验室;卵清蛋白 (OVA)、牛血清白蛋白 (BSA)、聚乙二醇 (PEG-20000)、氯金酸 ($\text{HAuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$),均购自 Sigma 公司;羊抗小鼠 IgG、TMB,购于武汉博士德生物有限公司;其他试剂均为国产分析纯;玻璃纤维素垫、硝酸纤维素膜、PVC 板、吸水垫、胶体金聚酯结合垫等耗材,购自上海捷宁生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

5417R 高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司; U3010 紫外可见光谱仪,日本 HITACHI 公司; HH W21-420S 电热恒温水浴箱,上海悦丰仪器仪表有限公司; RT-2100C 酶标分析仪,雷杜生命科学股份有限公司; Tecnai12 透射电子显微镜,荷兰 FEI 公司。

1.3 方法

1.3.1 胶体金免疫层析法的检测原理

本文检测采用竞争抑制免疫层析法。其原理为:利用胶体金标记 BPA 单克隆抗体,用 BPA-BSA 偶联物和羊抗小鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜上,形成检测线 (T) 和控制线 (C),用于快速检测样本中残留的 BPA。样本中若含有 BPA,在层析移动过程中与胶体金标记的 BPA 单克隆抗体结合,从而抑制了此胶体金

抗体与硝酸纤维素膜上包被的 BPA-BSA 偶联物的结合,结果 T 线不显色为阳性结果;反之若样本中不含 BPA,在层析移动过程中,则不会形成 BPA 与胶体金标记的 BPA 单克隆抗体结合物,当胶体金抗体标记物经层析作用继续到达硝酸纤维素膜上包被有 BPA-BSA 偶联物的检测区域时,与其结合形成 BPA-BSA 与胶体金标记的 BPA 单克隆抗体结合物,从而 T 线显色为阴性结果。

1.3.2 胶体金免疫层析试纸条的制备^[12]

首先,将 BPA-BSA 结合物抗原用点膜仪包被于硝酸纤维素膜的检测区 (T),羊抗小鼠 IgG 用点膜仪包被于硝酸纤维素膜的控制区 (C) 上,在 37 °C 烘箱中干燥完全,使原料牢固的吸附在硝酸纤维素膜上。然后,将胶体金标记单克隆抗体用金标稀释液稀释后喷涂在胶体金聚酯结合垫上,在 37 °C 烘箱中干燥至完全。最后,以 PVC 板作背衬,按顺序复合上玻璃纤维素样品垫、胶体金聚酯结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫 (如图 1)。

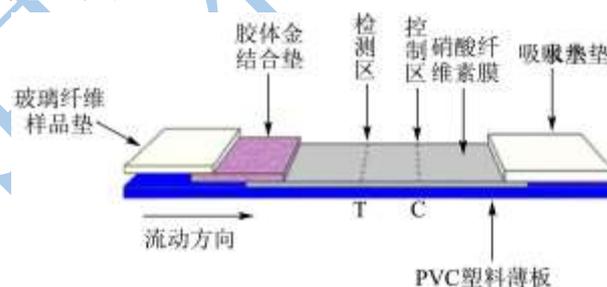


图 1 胶体金免疫层析试纸条组装图

Fig.1 Assemblage of the CGIA strip

将复合好的塑料薄板用切割机切成 5 mm×60 mm 的条,放入带有干燥剂的容器或铝箔中密封保存。

1.3.3 抗体的纯化和鉴定

采用辛酸-硫酸铵 (CA-AS) 沉淀法纯化,得到纯化的单克隆抗体(抗体由本实验室自制),用 IsoQuick Kit for Mouse Monoclonal Isotyping 对纯化后的抗体进行鉴定,鉴定其类型为 IgG2b 亚型。

1.3.4 胶体金的制备与表征

采用柠檬酸三钠还原氯金酸法制备胶体金^[13]:首先取 100 mL 超纯水,加入 1 mL 1% 的氯金酸溶液,加热至沸腾。然后在不断搅拌的同时迅速加入 1% 的柠檬酸三钠水溶液 2 mL,待溶液颜色由淡黄色变成黑色最终变成澄清的红色且不再变化,将溶液再继续煮沸 15 min,室温冷却后,加入超纯水定容到初始体积,4 °C 保存备用。胶体金通过紫外扫描光谱仪和透射电镜 (TEM) 进行表征。

1.3.5 胶体金标记抗体的制备与表征

以标记 1 mL 胶体金为例,具体标记过程如下:

首先,取 1 mL 胶体金溶液于干净的试管中,用 0.2 mol/L 的 K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液 pH 至 8.5。然后,缓慢向胶体金溶液中滴加适量单克隆抗体,轻微震荡混匀,室温下静置 1 h。再逐滴加入 10 μ L 10% 的 PEG-20000 和 10 μ L 10% 的 BSA,充分搅拌后静置 10 min。最后,将标记好的抗体采用低温超速离心法进行纯化,即在 4 $^{\circ}C$ 下,先将胶体金标记的抗体用 1500 r/min 的离心机低速离心 15 min,弃去沉淀,再将转速调至 10000 r/min 在 4 $^{\circ}C$ 下离心 30 min,离心后弃去上清液。用金标储存液溶解胶体金至原体积,重复上一步离心步骤,4 $^{\circ}C$ 保存备用。标记后的抗体通过紫外扫描光谱仪检测。

1.3.6 试纸条检测限的确定

如图 1 所示,滴加待测样品于玻璃纤维样品垫上时,由于虹吸作用,样品中的 BPA 与固定在检测线(T)上的包被抗原竞争结合胶体金标记的抗体。样品中 BPA 的含量越高,检测线(T)固定包被抗原与金标抗体结合的越少,从而使检测线(T)的颜色比空白对照试纸条的检测线的颜色浅。检测线(T)固定包被抗原所结合的金标抗体少于一定数量时,检测线(T)消色,如试纸条有效的话,质控线(C)总会显示红色。

用 PBS 溶液配制浓度分别为 0 ng/mL (阴性对照), 50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL 的 BPA 溶液,将配制好的标准溶液分别滴加到组装好的试纸条的样品垫上。10 min 后目视判断结果。检测限定义为以能与阴性对照的试纸条的检测线有明显颜色差别的 BPA 的最小浓度。

1.3.7 试纸条特异性测试

用本检测试纸条分别检测浓度为 100 ng/mL 双酚酸,壬基酚,辛基酚三种 BPA 的类似物,判断有无交叉反应。实验结果均为阴性,表明胶体金免疫层析试纸条具有较高的特异性。

2 结果与讨论

2.1 胶体金的制备与表征

本研究中制得的胶体金的溶液为红色的澄清溶液,无沉淀也无悬浮物和漂浮物。将该溶液用紫外扫描光谱在波长范围 400~700 nm 进行扫描,得到单一的吸收峰 $\lambda_{max}=530$ nm, $AU_{530}=0.91$,从峰形可知,峰形光滑,峰宽较窄,表明胶体金颗粒大小比较均一,见图 1 (a)。从扫描电镜图显示,胶体金颗粒大小较均匀,平均粒径约 30 nm,见图 2 (b)。以上结果表

明,胶体金颗粒的尺寸能够满足胶体金试纸条的制备。

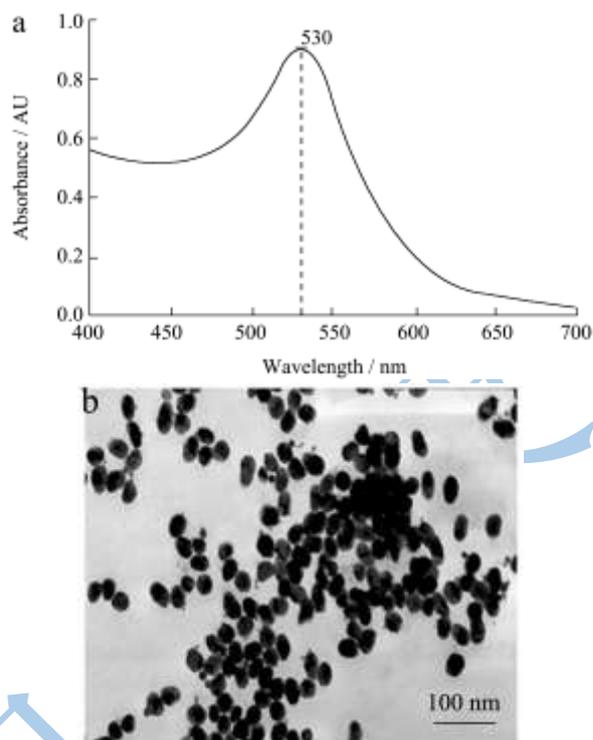


图 2 (a) 胶体金溶液的紫外扫描光谱图; (b) 胶体金颗粒透射电镜图

Fig.2 (a) UV absorbance spectrum of colloidal gold solution; (b) TEM image of colloidal gold particles

2.2 胶体金标记抗体的制备与表征

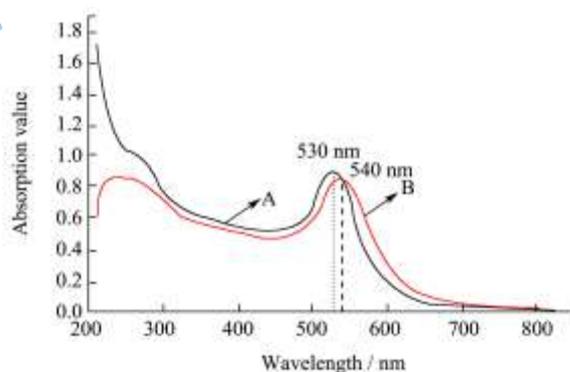


图 3 胶体金标记抗体的紫外扫描光谱图

Fig.3 UV absorbance spectrum of colloidal gold and antibody-colloidal gold conjugate

注: A: 胶体金; B: 胶体金标记的抗体。

图 3 是胶体金标记抗体的紫外扫描光谱图。在图 3 中, A 曲线为胶体金溶液的紫外光谱图,由于胶体金颗粒的表面等离子共振现象,故在 530 nm 有一特征吸收峰,加入抗体后,抗体被胶体金标记后表面共振频带略有红移,在曲线 B 中可以看到最大吸收波长移到 540 nm 处。这是抗体与胶体金颗粒的相互作用

引起的。表明该抗体被胶体金成功标记。

2.3 试纸条检测限的确定

本研究的主要目的是通过双酚A胶体金试纸目测检测 BPA。因此，我们配制一系列的 BPA 标准品 (0 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL) 的稀释液进行测试。如图 4 所示，该检测结果可在反应开始后 10 分钟目测判断出来。从图 4 中可以看到，BPA 浓度为 50 ng/mL 时 (第 4 条)，结果显示的检测线和控制线都具有明显的红色条带。而当 BPA 浓度达到 100 ng/mL 时 (第 3 条)，测试结果显示在检测线产生了一条非常微弱的红色。200 ng/mL 浓度的 BPA 在试纸条上仅显示 1 条红色条带 (第 2 条)。因此，此试纸的检测限约为 100 ng/mL。

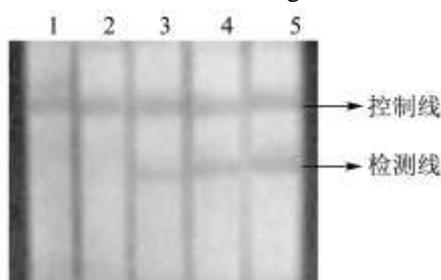


图 4 不同浓度 BPA 标准品显色示意图

Fig.4 Colors of the standards with different concentrations

Note: 1~4: 500 ng/mL, 200 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL BPA standard solution; 5: 10% methanol-water.

2.4 试纸条特异性测试

表 1 试纸与浓度为 100 ng/mL BPA 类似物的交叉反应

Table 1 Cross-reactivity of the strip to other analogues of BPA at concentration of 100 ng/mL

化合物		浓度/(ng/mL)				
		0	50	100	200	500
双酚 A	检测线	+	+	±	-	-
	控制线	+	+	+	+	+
双酚酸	检测线	+	+	+	+	+
	控制线	+	+	+	+	+
壬基酚	检测线	+	+	+	+	+
	控制线	+	+	+	+	+
辛基酚	检测线	+	+	+	+	+
	控制线	+	+	+	+	+

注：“+”：有明显的红色条带 (阳性结果)；“±”：有微弱红色条带；“-”：无明显红色条带 (阴性结果)。

胶体金免疫层析试纸对双酚酸、壬基酚和辛基酚的检测结果表明本试纸条与以上物质在 100 ng/mL 浓度时没有交叉反应，因此可判定本试纸条对 BPA 具有

较高的特异性，见表 1。

3 结论

3.1 目前，免疫胶体金技术已经被广泛的应用于体外快速检测，而免疫层析检测是其中一个重要发展方向。近年来，该技术在临床诊断得到了广泛的应用^[4]，目前主要应用于传染病、早孕、癌症等的检测。此外，该技术也在毒素、环境污染物、药残留等非临床检测方面开始应用。

3.2 胶体金免疫层析试纸条检测方法属于定性半定量方法，操作简便，快捷、无需借助大型检测仪器，检测时只需将样品处理液通过试纸条即可进行检测。本研究建立的 BPA 试纸条检测方法检出限为 100 ng/mL，10 min 内可以目测判定结果。样品处理简便，且所用试剂均无毒、无污染，是现场快速检测 BPA 残留的有效检测方法，同时对环境中 BPA 残留的监控有重要意义。

参考文献

- [1] 张彦丽,任佳丽,李忠海等.食品包装材料中双酚A的研究进展[J].食品与机械,2011,1:155-157,174
ZHANG Yan-li, REN Jia-li, LI Zhong-hai, et al. Progress on bisphenol A in food packing materials [J]. Food & Machinery. 2011, 1: 155-157, 174
- [2] 姚卫蓉.食品包装污染物研究进展[J].现代食品科技, 2005, 1: 150-153
YAO Wei-rong. Development advances of contaminants from food wrapper [J]. Modern Food Science and Technology, 2005, 1: 150-153
- [3] STAPLES Charles-A., DOME Philip-B., KLECKA Gary-M., et al. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A [J]. Chemosphere, 1998, 36(10): 2149-2173
- [4] 郭永梅.双酚A的危害及相关限制法规[J].现代食品科技, 2012, 5:549-551
GUO Yong-mei. Analysis of health hazards, legal restrictions and regulations for BPA [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 5: 1595-1599
- [5] REZG Raja, EL-FAZAA Saloua, GHARBI Najoua, et al. Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives [J]. Environment International, 2013, 64C: 83-90
- [6] XIAO Shuo, DIAO Hong-lu, SMITH Mary Alice, et al. Preimplantation exposure to bisphenol A (BPA) affects embryo transport, preimplantation embryo development, and

- uterine receptivity in mice [J]. *Reproductive Toxicology*, 2011, 32(4): 434-441
- [7] TEEGUARDEN Justin G., HANSON-DRURY Sessa A. A systematic review of Bisphenol A "low dose" studies in the context of human exposure: a case for establishing standards for reporting "low-dose" effects of chemicals [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 62: 935-948
- [8] MANIKKAM Mohan, TRACEY Rebecca, GUERRERO-BOSAGNA Carlos, et al. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e55387
- [9] VOM Saal F S, NAGEL S C, COE B L, et al. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, 354(1-2): 74-84
- [10] YANG Xiao-xia, DOERGE Daniel-R, FISHER Jeffrey-W. Prediction and evaluation of route dependent dosimetry of BPA in rats at different life stages using a physiologically based pharmacokinetic model [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013, 270(1): 45-59
- [11] 张丽莎,瞿思宜,倪健等.双酚A检测技术研究进展[J].杭州师范大学学报(自然科学版),2013,05:456-461
ZHANG Li-sha, QU Si-yi, NI Jian, et al. Research advances of bisphenol A detection techniques [J]. *Journal of Hangzhou Normal University (Natural Science Edition)*, 2013, 05: 456-461
- [12] 吴巧丽,叶春生.胶体金免疫层析技术快速检测沙丁胺醇残留 [J].现代食品科技,2012,11:1595-1599
WU Qiao-li, YE Chun-sheng. Colloidal gold immunochromatographic assay for residual salbutamol [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 11: 1595-1599
- [13] 李卫玲,叶阳,周有祥等.柠檬酸三钠法制备胶体金的工艺条件优化[J].湖北农业科学,2010,10:2529-2532
LI Wei-ling, YE Yang, ZHOU You-xiang, et al. Optimization of preparation technique of colloidal gold by sodium citrate method [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2010, 10: 2529-2532
- [14] 许欣,王锋.免疫胶体金技术及其在临床诊断上的研究进展 [J].江西农业学报,2009,06:125-128
XU Xin, WANG Feng. Immune colloidal gold technique and its application in clinical diagnosis [J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2009, 06: 125-128