

分类号 TS201.6

密级 公开

UDC 606

编号 10299Z1918023

江蘇大學

JIANGSU UNIVERSITY

专业学位硕士学位论文



Professional degree master's Thesis

鸡肉中 PCBs 免疫学检测方法研究

IMMUNOLOGICAL DETECTION OF PCBs RESIDUES IN CHICKEN

作者姓名 韩昌

指导教师 张存政 职 称 研究员

申请学位级别 硕 士 专业名称 食品工程

论文提交日期 2022.6.13 论文答辩日期 2022.6.1

学位授予单位和日期 江苏大学 2022 .06.17

ClassifiedIndex:TS201.6

UDC:606

Master Dissertation

By Han Chang

Major: Food Engineering

Supervisor:Prof. Cunzheng Zhang

Jiangsu University

June, 2022

独创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已注明引用的内容以外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果，也不包含为获得江苏大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：



年 月 日

学位论文版权使用授权书

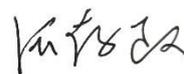
江苏大学、中国科学技术信息研究所、国家图书馆、中国学术期刊（光盘版）电子杂志社有权保留本人所送交学位论文的复印件和电子文档，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致，允许论文被查阅和借阅，同时授权中国科学技术信息研究所将本论文编入《中国学位论文全文数据库》并向社会提供查询，授权中国学术期刊（光盘版）电子杂志社将本论文编入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》并向社会提供查询。论文的公布（包括刊登）授权江苏大学研究生院办理。

本学位论文属于不保密 。

学位论文作者签名：



指导教师签名：



年 月 日

年 月 日

摘 要

多氯联苯 (Polychlorinated biphenyls, PCBs), 为具有 209 种同系物的苯环状家族类有机化合物。因其稳定的理化性质 (耐热、电绝缘、抗氧化等), 被广泛用于变压器、电容器、润滑油等。随着工业排放, 广泛存在于土壤、空气和水体中。通过食物链累积富集进入人体, 引发疾病。由于在环境中极为稳定, 被列为持久性有机污染物 (Persistent organic pollutants, POPs)。因此, 开发并应用快速、精准、可广谱检测 PCBs 家族化合物的免疫学检测方法, 作为仪器分析的有效补充, 对保障食品安全尤为重要。

在本研究中, 根据 PCBs 核心结构, 设计并合成了三种不同氯化结构半抗原, 免疫小鼠获得广谱识别 11 种 PCBs 的单克隆抗体, 基于该抗体材料, 研发了胶体金免疫层析检测方法和聚集诱导发光固相免疫检测方法, 结果如下:

(1) 半抗原合成与单克隆抗体制备: 合成三种不同结构的半抗原 PCBa, PCBb, PCBc, 经质谱与核磁共振氢谱鉴定合成成功。利用活泼酯法将其分别与不同的载体蛋白 BSA、KLH 和 OVA 偶联, 制备免疫原和包被原。通过免疫 BA1B/c 小鼠、细胞融合、亚克隆等步骤制备单克隆抗体。免疫结果表明, 以 PCB80 为母体的羧酸衍生物半抗原 PCBc 能够诱导产生广谱识别 PCBs 的抗体。进而筛选获得单克隆杂交瘤细胞株 C6-H8, 其抗体亚型为 IgG1, 可广谱识别 11 种 PCBs 其半数抑制浓度 (IC_{50}) 范围为 33.12-476.42 ng/mL。

通过基因测序获得抗体可变区基因, 利用分子模拟构建 3D 模型并对接。结果表明, 该抗体与多氯联苯小分子之间的分子作用力主要为酪蛋白与小分子之间的苯环 π - π 键堆叠和卤键, 揭示了对 11 种 PCBs 的识别机制。

(2) 胶体金免疫层析检测方法的建立: 利用氯金酸还原法制备直径为 20 nm 的金纳米颗粒。标记已获得的单克隆抗体, 建立以胶体金为探针的免疫层析方法 (Lateral flow immunoassay, LFIA)。经优化 pH、抗体量、包被原浓度以及探针量等条件, 结果表明对 PCB80, PCB169, PCB126, PCB189 这 4 种多氯联苯肉眼检测 Cut-off 值 (临界值) 为 2-5 μ g/mL, 其余 7 种肉眼检测值均大于 5 μ g/mL。

(3) 聚集诱导发光固相免疫检测方法的建立: 以聚集诱导发光荧光微球 (Aggregation-induced emission fluorescent microsphere, AIEFM) 为信号标记物, 分

别建立了荧光试纸条与竞争型固相免疫检测方法,并对鸡肉中 PCBs 残留进行方法验证。荧光试纸条检测 PCB80 肉眼检测 Cut-off 值为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在最佳条件下,与 ELISA 方法相比,竞争型固相免疫检测方法对 11 种 PCBs 的 IC_{50} 值提高到 6.38-252.1 ng/mL ,检测限 (LOD) 在 0.32-42.15 ng/mL 之间。方法验证结果表明,通过稀释消除基质干扰,可实现对加标鸡肉样品的精准检测,回收率为 76.90%-91.64%,变异系数为 8.5%-14.4%。此外,与 GC-MS/MS 仪器法对比,两种方法的检测结果一致,证明所建方法具有良好的准确性。

以上研究为检测多氯联苯家族类化合物提供了一种简单、广谱和灵敏的检测工具,为快速、高通量筛查食品中的 PCBs 提供了可能。

关键词: 多氯联苯; 半抗原; 广谱型单克隆抗体; 胶体金免疫层析; 聚集诱导发光。

Abstract

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are benzene cyclic family compounds with 209 homologues. Due to stable physical and chemical properties (heat resistance, electrical insulation, oxidation, etc.), PCBs are widely used in commercial applications such as transformers, capacitors and lubricating oils. With Improper industrial discharge, they widely dispersed into soil, air and water. They could eventually accumulate in human body and pose risk to human health through bioaccumulation and food chain enrichment. Because extremely stable in the environment, PCBs are listed as persistent organic pollutants (POPs), but still exist widely in the environment and food. Therefore, the development of rapid, accurate and broad-spectrum detection methods for PCBs family compounds are particularly important to ensure food safety and are effective supplements to instrumental analysis.

In this study, by simulating the core structure of polychlorinated biphenyls, three haptens with different chlorinated structures were designed and synthesized. Therefore, a monoclonal antibody was induced and generated which could recognize 11 homologues of PCBs. Based on the antibody materials, colloidal gold immunochromatographic detection methods and immunoassay methods with aggregation induced luminescent microspheres were developed. The results are as follows:

(1) The preparation of haptens and monoclonal antibodies: Three haptens (PCBa, PCBb and PCBc) with different chlorinated structures were successfully synthesized which were confirmed by Mass spectrometry and Nuclear magnetic resonance (NMR). Immunogen and coating antigen were prepared by coupling haptens with different carrier proteins BSA, KLH and OVA by active ester method. Broad spectrum monoclonal antibodies were obtained by immunizing BALB/c mice, cell fusion and subcloning. The results showed that mice immunized with carboxylic acid derivative hapten PCBc with PCB80 structure-liked induced a monoclonal antibody with recognition ability to PCBs. The monoclonal hybridoma cell line (C6-H8) was screened with IgG1 subtype of antibody which could recognize 11 kinds of polychlorinated biphenyls. The identification of ELISA results showed that the IC_{50} of 11 kinds of polychlorinated biphenyls ranged from 33.12 to 476.42 ng/ml.

After obtaining the complementarity determining region (CDR) gene of antibody, the 3D model was constructed by molecular simulation and simulated docking by

AutoDock-Vina. The results showed that the intermolecular forces between the antibody and small molecules with common structure of PCBs were mainly the stacking of benzene ring π - π bonds and halogen bonds between casein and small molecules.

(2) Establishment of colloidal gold immunochromatography strip: For the purpose of rapid detection on-site, gold nanoparticles with a diameter of 20 nm were prepared by chloroauric acid reduction method. an immunochromatography method (LFIA) with colloidal gold as probe material was established using the obtained monoclonal antibody against PCBs. The results showed that the cut-off value (critical value) of PCB80, PCB169, PCB126 and PCB189 were 2-5 $\mu\text{g/ml}$, and the naked eyes detection values of the other 7 PCBs were greater than 5 $\mu\text{g/mL}$.

(3) Establishment of Immunoassay with Aggregation Induced Emission Fluorescent Microsphere (AIEFM): Fluorescence test strip and competitive solid-phase immunoassay were established respectively. The cut off value of PCB80 detected by fluorescent test strip is 1 $\mu\text{g/mL}$. Under the optimum experimental conditions, compared with ELISA, the IC_{50} value of 11 PCBs was increased to 6.38-252.1 ng/ml, and the detection limit (LOD) was between 0.32 and 42.15 ng/ml. The results showed that the accurate detection of spiked chicken samples could be achieved by eliminating matrix interference through dilution. The recovery was 76.90%-91.64% and the coefficient of variation was 8.5%-14.4%. In addition, the comparison with GC-MS/MS instrument method shows that the detection results of the two methods are consistent, which proves that the established method has good accuracy.

In summary, the above developed methods provided a simple, broad-spectrum and sensitive tool for the detection of PCBs family compounds, and makes it possible for rapid and large-scale screening of PCBs in food.

Keywords: Polychlorinated biphenyls; Hapten; Broad spectrum monoclonal antibody; Colloidal gold immunochromatography; Aggregation induced luminescence

目 录

摘 要	I
Abstract	III
第一章 绪论	1
1.1 多氯联苯概述	1
1.1.1 多氯联苯的结构与理化性质	1
1.1.2 多氯联苯的来源与应用	2
1.1.3 多氯联苯残留现状与危害	3
1.2 多氯联苯相关法律法规残留限定	5
1.3 多氯联苯残留检测技术研究进展	7
1.3.1 仪器分析方法	7
1.3.2 免疫学分析方法	7
1.4 研究目的与意义	10
第二章 多氯联苯广谱型单克隆抗体的制备及其性能鉴定	11
2.1 引言	11
2.2 材料与方法	12
2.2.1 主要试剂和材料	12
2.2.3 缓冲液配方及细胞培养液	13
2.2.4 半抗原的合成	15
2.2.5 人工抗原的偶联	18
2.2.6 小鼠免疫过程	19
2.2.7 杂交瘤细胞融合与筛选	21
2.2.8 单克隆抗体的制备与性能鉴定	23
2.2.9 抗体与分子模拟对接	25
2.3 结果	26
2.3.1 半抗原合成鉴定	26
2.3.2 人工抗原偶联鉴定	29
2.3.3 免疫过程尾血评价	31
2.3.4 杂交瘤细胞融合与筛选评价	33
2.3.5 抗体制备与纯化	34
2.3.6 单克隆抗体的性能鉴定	35

2.4 讨论	40
2.5 小结	41
第三章. 胶体金免疫层析法检测多氯联苯的建立	42
3.1 引言	42
3.2 材料与方法	42
3.2.1 试剂和材料	42
3.2.2 仪器设备	42
3.2.3 缓冲液配制与预处理	43
3.2.4 胶体金的制备	43
3.2.5 胶体金标记探针的制备	43
3.2.6 胶体金试纸条组装与结果判定	44
3.2.7 质控线、检测线浓度及金标探针量的优化	46
3.2.8 试纸条最低检出限与交叉反应测定	46
3.2.9 试纸条稳定性评价	47
3.2.10 基质效应与添加回收	47
3.3 结果	47
3.3.1 胶体金的制备与鉴定	47
3.3.2 金标抗体制备	48
3.3.3 试纸条最低检出限与交叉反应	50
3.3.4 试纸条的稳定性	51
3.3.5 基质干扰与添加回收	52
3.4 讨论	53
3.5 小结	53
第四章 基于聚集诱导发光荧光微球固相免疫方法检测鸡肉中的多氯联苯	54
4.1 引言	54
4.2 材料与方法	54
4.2.1 主要试剂和材料	54
4.2.2 主要仪器设备	54
4.2.3 荧光探针的制备及条件优化	55
4.2.4 AIEgens 荧光微球固相免疫方法的建立与优化	55
4.2.5 基于 AIEgens 荧光微球免疫方法检测 PCBs	57

4.2.6 添加回收.....	57
4.2.7 仪器方法验证.....	58
4.3 结果.....	58
4.3.1 荧光探针的表征.....	58
4.3.2 AIE 荧光微球免疫层析试纸条.....	60
4.3.3 实验参数优化.....	60
4.3.4 免疫实验的结果.....	62
4.3.5 基质干扰与添加回收.....	63
4.4 讨论.....	65
4.5 小结.....	66
第五章 全文总结与展望.....	67
参考文献.....	68
致谢.....	76
在学期间发表的学术论文及科研成果.....	77

第一章 绪论

随着经济发展,人民生活水平的提高,对饮食结构的需求趋于便捷化、多元化,但近年来,食品安全事件层出不穷,威胁人类安全。2022年市场监管总局抽检结果表明食品中农药、兽药、环境污染物以及微生物残留超标,食品添加剂的非法添加等现象依然存在(www.samr.gov.cn)。这些有害物质通过食品进入人体,随着时间在生物体内富集,进而导致一系列的疾病的爆发。

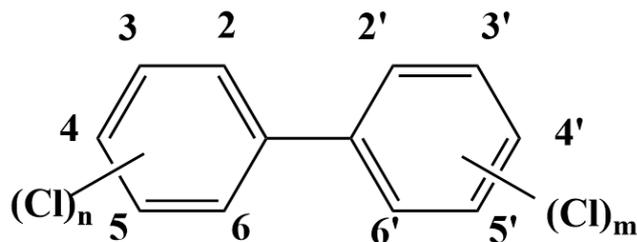
多氯联苯(Polychlorinated biphenyls, PCBs)具有强致癌性,2001年作为12种持久性有机污染物(POPs)之一被列入《斯德哥尔摩公约》(<http://chm.pops.int>)。1967年日本的米糠油事件^[1],1979年中国台湾油症事件^[2],1999年比利时多氯联苯,二噁英危机^[3],多氯联苯污染已将美国安尼斯顿小镇变成“死亡之城”^[4]。这些事件导致几十万只家禽突然死亡,造成重大的粮食危机,同时当地居民因此患严重的皮肤病,死亡人数达数万余人。多氯联苯在空气、水、土壤等环境中普遍存在且具有生物蓄积性,通过不同方式暴露于人体,其中饮食为最主要途径,引起高度关注。

1.1 多氯联苯概述

1.1.1 多氯联苯的结构与理化性质

多氯联苯(Polychlorinated biphenyls, PCBs),化学结构如图 1.1;CAS号 No:1336-36-3;分子式为 $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ 。PCBs 是一类由碳、氢和氯原子组成的人工合成有机化合物。氯原子的数量及其在分子中的位置决定了 PCBs 的物理和化学性质。PCBs 没有已知的味道或气味,稠度随着氯原子数的增加从油到蜡状不等^[5]。

PCBs 的理化性能非常稳定,无腐蚀性,疏水亲脂,具有极强耐酸碱和抗氧化能力^[6],因优越的绝缘性以及高度耐热可达 1400°C 等特性备受关注^[7]。



Polychlorinated biphenyls(PCBs)

图 1.1 多氯联苯化学结构式

Fig. 1.1 Chemical structure formula of polychlorinated biphenyls

环境持久性：PCBs 在自然环境下，无法通过光照、化学腐蚀以及微生物代谢等途径降解。当进入水体、土壤等介质中半衰期为 40 年，少部分通过转基因植物和相关细菌构成的新一代转基因生物酶作用发生转化^[8]。日本环境省开展的一项为期 16 年的监测计划（2003-2018），结果表明大气中五氯苯和六氯苯的浓度相对稳定且有增加趋势^[9]。PCBs 在日本和台湾已经被禁止了几十年，但是在 2021 年一项调查中显示仍然能在母乳和胎儿体内检测到^[10]。

半挥发性：氯化的程度会影响 PCBs 在不同的颗粒物表面吸附，从水体或者土壤挥发以蒸汽形式进入大气，在环境中进行远距离迁移，然后伴随降雨降雪等重新沉降到地表，无限循环。山河湖泊^[11]、雪域高原、飞禽走兽^[12]、植物^[13]等无处不在，PCBs 污染已成为全球性的问题^[14]。

生物蓄积性：PCBs 作为脂溶性污染物，常残留富集于脂肪组织，从环境媒介中蓄积到生物体并伴随食物链浓缩成为主要模式，以至于食物链顶端毒性最大。自由放养的肉鸡每天约摄入 30 g 土壤，而鸡蛋脂肪中二噁英和共面 PCBs 的毒性总和远超欧盟食品标准规定的 5 pg TEQ/g，表明已从土壤中蓄积到鸡体内^[15]。在波兰从农村到城市地区的河流中收集的沉积物和鱼类都含有二噁英和 PCBs 且浓度皆超过消费者的耐受量^[16]。北美野生山猫体内多氯联苯浓度明显超过正常水平^[17]，表明环境中 PCBs 已进入食物链。这些数据揭示了即使环境中存在低浓度 PCBs，最终也会通过食物链富集到顶端，造成危害。

1.1.2 多氯联苯的来源与应用

PCBs 由德国科学家 H.Schmidt 和 G.Schuts 于 1881 年首次合成，目前没有已知的 PCBs 天然来源（www.epa.gov/pcbs）。根据苯环上氯原子的不同数量与位置

组合,理论上多氯联苯有多达 209 种单独同系物。其中,满足 4 个及以上的氯原子且在邻位有一个或没有取代的 12 种 PCBs 具有二噁英毒性被称为“类二噁英类多氯联苯”,包括 No.77、81、105、114、118、123、126、156、157、167、169 和 189。另外 7 种无二噁英的毒性,但有不同的毒理学特性为指示性多氯联苯包括 No.28、52、101、118、138、153 和 180^[18]。在美国,许多商用 PCBs 混合物的商标名为 Aroclor,中国按被氯取代的原子个数命名。

PCBs 被大规模商业化使用,包括电容器和变压器中的介质流体、传热流体、液压液、润滑油,以及作为油漆、染料和塑料添加剂等^[19]。它们的商业用途主要是基于其稳定理化性能,包括低可燃性,电绝缘性能等。美国最先于 1929 年开始生产 PCBs,它们被大规模生产了 40 多年,20 世纪 80 年代被禁止,在 60 年代中期,全世界生产 PCBs 远超 100 万吨。在德国,6 万吨 PCBs 被用于变压器、电容器或作为液压油,其中 30%至 50%的 PCBs 没有得到适当的管理。在西德,24000 吨 PCBs 被应用于公开场合,主要作为添加剂、密封剂和油漆等并且一直使用没有被禁止,在 2013 年,估计仍有超过 1.2 万吨的 PCBs 存在于建筑中。估计每年 7-12 吨应用于公开场合的 PCBs,持续释放到环境中^[20]。我国 1965 年开始生产 PCBs,1974 年禁止生产和使用,这期间生产了约 10000 吨的 PCBs,其中三氯联苯 9000 吨,五氯联苯 1000 吨^[21]。我国 PCBs 的使用主要汇集于中、东部人口密集和工业发达区,导致我国东部地区残留最为严重。

1.1.3 多氯联苯残留现状与危害

因证据表明 PCBs 在环境与食物链中累积富集,对人类健康造成有害影响,世界各国逐步禁止生产。大多数过时的含 PCBs 的设备被禁用并储存起来,其中有部分泄漏到周围环境中,对健康和环境构成威胁。与此同时,还有非法拆除或处置含 PCBs 的设备,通过随意焚烧含氯废弃物所产生的副产品,以及某些涉及有机氯的化学过程^[22]。1977 年以前制造的可能含有 PCBs 的产品包括荧光照明灯具和电容器的电气设备^[23],显微镜和液压油^[24]等其他工业应用,其中大约有 1/3 的 PCBs 进入人类生活,造成污染。自 1929 年以来,全世界的累计 50 万吨以上 PCBs 被弃入垃圾填埋场,部分随工业废水进入河流,渗漏到土壤^[25]。按照《斯德哥尔摩公约》,签署国需采取措施,减少并消除 PCBs 在环境中的释放,经过了十几年的努力,还是能发现 PCBs 的存在。

尽管 PCBs 已被停产和禁止使用多年, 工业生产的 PCBs 依然是环境污染和危害人类的主要来源。资料表明, PCBs 在水体、沉积物、土壤和大气介质中普遍存在。白璐等^[26]对华东地区的不同深度水体进行采样结果显示五氯联苯的检出率为 100%。黄智峰等调查了洞庭湖 PCBs 污染情况, 采集 21 个地点并对入湖河流进行同位素高分辨质谱定量检测分析, 检测到 50 种 PCBs 同系物^[27]。程家德等^[28]检测了太湖上游地区地表水和沉积物, 发现主要成分包含五氯和六氯。在克罗地亚的 3 个湖泊(普罗什奇湖, 科兹贾克湖, 卡卢罗维瓦克湖)沉积物中检测出 11 种有机氯农药(OCP)及其降解产物以及 17 种 PCBs^[29]; 张亚萍等^[30]对某电子垃圾拆解区废渣、土壤和蔬菜中 PCBs 进行评估, 发现其中残留的 PCBs 以三氯联苯、五氯联苯等低氯为主。1945 年至 1983 年间, 中国是世界上最大的 PCBs 生产国, 其中黄海和渤海沿岸城市生产和使用 PCBs 比例较大。在黄海和渤海周围采集的表层土壤中检测到了 7 种指示性 PCBs, 其中河北省的 PCBs 残留浓度最高^[31]。大气中的 PCBs 污染物不仅是人体不可避免的接触途径, 而且可能随全球气流循环迁移到任何一个区域。芝加哥空气样品中测到羟基化多氯联苯(OH-PCBs), 这表明 Aroclors 是大气中 OH-PCBs 的传统来源, 并且与 Aroclors 中的 PCB 成比例^[32]。在对蜜蜂和蜜蜂产品中 PCBs 的含量及其环境空气浓度进行评估, 发现高分子量 PCBs 从空气移动到花粉介质(沉积), 而低分子量 PCBs 从花粉介质移动到空气(挥发)^[33]。种种迹象表明前期的工业发展, 使得河流、土壤和大气、动物、植物中均有 PCBs 的身影, 对人类健康构成了潜在威胁。

PCBs 脂溶性较强, 可在食物链中进行生物富集。最近一项对 26 种食品中 PCBs 残留的研究表明, PCBs 已然进入人类餐桌^[34]。发生在日本、中国台湾和比利时的众所周知的“二噁英事件”导致了极其严重的公共卫生灾难^[3]。PCBs 可通过血液循环到达神经肌肉连接处^[35], 导致与大脑和风湿疾病相关的神经元损伤^[36]。根据流行病学研究表明, PCBs 作为致癌启动子可能通过氧化应激机制抑制细胞间信号传递危害肝脏、胆道和肠道等, 长期暴露于环境中的多氯联苯可能会导致内分泌系统紊乱, 并增加患癌症的风险^[37]。同时, PCBs 会显著降低动物的生育能力并影响生殖系统, 干扰表观遗传修饰过程, 目前尚无有效抑制^[38]。Wang 等^[39]利用雌性大鼠反复吸入含有 PCBs 的学校室内空气, 发现 PCBs 在体

内脂肪组织中含量最多,利用转录组学和代谢组学发现,PCBs 不仅损伤记忆力,而且显著减少白细胞数量。

1.2 多氯联苯相关法律法规残留限定

由于 PCBs 污染引起危害导致社会公共安全事件频发,国外在 20 世纪七十年代,开始制定相关法律法规。PCBs 的残留受到各国相关组织的严格管制。美国环境保护局 (EPA) 规定饮用水中多氯联苯的最大残留限量为 0.5 ng/mL; 美国食品和药物管理局 (FDA) 控制所有食品中的残留浓度应为 0.2-3 $\mu\text{g/g}$; 世界卫生组织 (WHO) 将多氯联苯的每日最大摄入量设定为 0.6 $\mu\text{g/kg}$ (wwwn.cdc.gov/TSP/ToxFAQs/ToxFAQsDetails); 欧洲食品安全局规定了食品中残留限量如表 1.1 所示 (www.efsa.europa.eu/en/efsa_journal)。

表 1.1 食品中 PCBs 残留限量

Table 1.1 Residue limits of PCBs in food

Foodstuffs	Maximum levels		
	Sum of dioxins (WHO-PCDD/F- TEQ)	Sum of dioxins and dioxin-like PCBs (WHO-PCDD/F- TEQ)	Sum of PCB28, PCB52, PCB101, PCB138, PCB153, and PCB180
Hen eggs and egg products	2.5 pg/g fat	5.0 pg/g fat	40 pg/g fat
Fat of the following animals	2.5 pg/g fat	4.0 pg/g fat	40 pg/g fat
-bovine animal and sheep	1.75 pg/g fat	3.0 pg/g fat	40 pg/g fat
-poultry	1.0 pg/g fat	1.25 pg/g fat	40 pg/g fat
-pigs			
Mixed animal fats	1.5 pg/g fat	2.5 pg/g fat	40 pg/g fat
Vegetable oils and fats	0.75 pg/g fat	1.25 pg/g fat	40 pg/g fat
Foods for infants and young children	0.1 pg/g wet weight	0.2 pg/g wet weight	1.0 ng/g wet weight

目前而言，意识观念不足、综合法规匮乏，我国的多氯联苯管理机制体系相对落后。因此，建立一种合适、完善高效且准确的管控体系来监督食物链或环境中的 PCBs 尤为重要。

1.3 多氯联苯残留检测技术研究进展

多氯联苯作为《斯德哥尔摩公约》中首批持久性有机污染物质,近年来随着科技进步且多样,为检测多氯联苯提供了更多选择,主要包括仪器检测法和免疫学快速检测法。

1.3.1 仪器分析方法

当前国内外关于 PCBs 的检测分析大部分为仪器法,对 PCBs 进行提取、净化与测定。HPLC 与 UV 相结合是 PCBs 分析中最常用的色谱技术^[40], LCMS 适用于在比紫外线检测高出 1000 倍的低检测限下进行量化。目前已经建立的 GC-MS^[41]、LC-MS/MS 和高分辨率气相色谱/高分辨率质谱(HRGC/HRMS)^[42]等方法可用于从不同的样品基质中对 PCBs 进行定量。Li 等^[43]开发了一种以庚酸为萃取剂提取 PCBs,利用气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS),PCB28、PCB53、PCB206 的检测限为 3 ng/L, PCB118 为 5 ng/L。Baroudi 等^[44]利用 GC-MS/MS 对针叶树中 PCBs 等检测限可达 20 ng/g。这些基于仪器的方法提供了高灵敏度和精确的结果。

1.3.2 免疫学分析方法

免疫分析方法(Immunoassay)是将免疫反应(抗原与抗体的特异性结合,抗原或抗体示踪物标记从而放大反应信号)和检测方法相结合的即时检测技术(Point of care test, POCT)。随着技术的发展,酶免疫测定法、酶抑制法、试纸法、荧光免疫测定法等可用于快速体外检测,广泛用于抗原、抗体、肽、蛋白质、激素等分子的定量检测。此外,免疫分析的使用涵盖了临床诊断^[45]、食品安全^[46]和环境监测^[47]等多方面,而免疫分析方法的关键是获得优质抗体。

1.3.2.1 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法自 1971 年用于 IgG 定量测定后得到快速应用。原理为将已知的抗原或抗体吸附于固相载体,然后抗原-抗体在其表面进行反应,去除体系中的游离成分,结合酶催化底物显色^[48]。包括直接、间接、夹心、竞争等。其优点是成本低廉、操作简单且短时间内能对大量样品现场检测。

酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方法已经商业化用于 PCBs 的分析。Tomoaki 等^[49]为了评估零售鱼中是否残留 PCB118, 研发了 ELISA 试剂盒, 结果与高分辨率气相色谱/高分辨率质谱一致。此外, Chen 等^[50]制备多克隆抗体利用间接竞争 ELISA 检测空气中的 Aroclor1248, 平均 IC_{50} 值为 16.21 $\mu\text{g/L}$; 邓安平等^[51]通过制备多克隆抗体, 利用 ELISA 以 Aroclor1242 (主要含 4,4'-二氯联苯) 为标准溶液, 测得 $IC_{50}=205 \text{ ng/mL}$ 。Xu 等人^[52]制备抗 PCBs 多克隆抗体, 利用间接竞争 ELISA 法检测 PCB77、PCB169、PCB126, IC_{50} 分别为 18、186 和 31 ng/mL 。由于 PCB 有多种同系物, 通常残留不止一种, 因此开发一种新型抗体广谱识别 PCBs 的共同结构是一项艰巨的任务。关于这一点, 相关学者已经设计不同的半抗原, 以获得广谱免疫反应性。Chiu 等^[53]人开发了一种基于单克隆抗体 (mAb) 的酶免疫分析法, 对 PCB77 和 PCB126 具有高度选择性 (IC_{50} 值分别为 0.9 和 1.2 ng/mL), 但没有检测到更普遍和毒性更小的非共面 PCBs 同源物。此外, Franek 等人^[54]也报道了一种基于多克隆抗体的 ELISA, 对 PCB77 和 PCB126 具有选择性 (IC_{50} 值分别为 2.0 ng/mL 和 5.2 ng/mL)。然而, 对一些有机溶剂, 如二甲亚砜 (DMSO) 的耐受性也很低。

1.3.2.2 胶体金免疫层析

胶体金免疫层析 (colloidal gold immunochromatography) 技术是以胶体金为示踪物应用于免疫反应的一种标记技术。胶体金为柠檬酸三钠与氯金酸 (HAuCl_4) 氧化还原成特定粒径的金纳米颗粒并呈稳定可见紫红色或粉红色^[55]。金纳米颗粒具有独特的光学特性, 性质稳定、易于合成、生物相容性良好。胶体金免疫层析试纸条 (检测卡) 作为一种快速检测手段, 简单经济、稳定无污染。在弱碱性条件下标记单克隆抗体, 带负电荷胶体金和带正电荷的蛋白质发生静电吸附成为探针, 且保留蛋白的生物活性。检测一般只要 5-10 min 就会出结果。该技术已经在农药小分子等化合物检测领域广泛应用。万宇平等^[56]成功制备胶体金免疫层析试纸条检测 PCB118, 最低检测线可达 10 $\mu\text{g/kg}$, 与其他同系物无交叉反应。

1.3.2.3 基于 AIEgens 微球免疫方法

发光材料理论上可以用于气态、液体和固体, 而在实际应用中多为薄膜和聚集体。在聚集状态下, 与稀溶液相比, 发光团可能表现出减少、不变或增强的发

射。在许多传统的情况中,发光材料会有部分或全部猝灭现象。自 1954 年 Forster 等^[57]发现浓度猝灭效应以来,聚集致猝灭(Aggregation caused quenching, ACQ)现象已经被研究了半个多世纪。从现实应用角度来看,在大多数情况下聚集导致猝灭害大于利。

聚集诱导发射(Aggregation-Induced Emission, AIE)是一种与生色团聚集有关的光物理现象,于 2001 年被唐本忠团队发现^[58]。孤立分子状态的非发射光物质可在形成聚集体时被诱导发射强荧光^[59]。由于高亮度、低背景和强大的抗光漂白能力,众多学者开始探索这些材料构建新的传感器。利用 AIE 染料的独特特性来规避浓度猝灭效应、增强光强度并延长持续时间进行体内肿瘤成像^[60];通过结合聚集诱导发光和间接竞争 ELISA,建立了一种新的基于荧光“开启”探针的免疫传感器,用于检测食品中的药物残留,使用金刚烷胺(AMD)作为检测模型,可以实现对鸡肌肉样品中 AMD 浓度的定量,IC₅₀ 值为 0.38 ng/mL^[61]。在酶联免疫试验的基础上结合生物素和链霉亲和素系统,利用 AIE 纳米珠构建免疫分析平台对两种不同目标物的检测灵敏度分别提高了 45 倍和 12 倍^[62]。AIEgens 近年来成为研究热点,它的各种性能有待探索,因此,开发一种基于 AIEgens 的荧光传感器检测方法具有重要意义。

1.3.2.4 其他免疫传感检测方法

近些年,基于抗体的生物传感器得到快速发展。免疫传感器是免疫分析法在 PCBs 检测中最常见的应用之一。基于抗体和靶标之间的生物相互作用,然后是转导、扩增和检测。比如电化学抗体生物传感器:Laschi 等人^[63]开发了一种基于碳网印刷的一次性电极的免疫传感器,用于识别 PCBs。HRP 酶标记抗体,过氧化氢与二茂铁羧酸(Ferrocenemonocarboxylic acid, FCA)作为底物与电子介质,构建了 PCBs 的间接和直接竞争分析方法。基于拉曼光谱, Sun 等^[64]展示了用于 PCB77 检测的无标记适配体传感器,适配体被固定在具有 S-Ag 键的银纳米棒阵列上,在 PCB77 的存在下,适配体转变为发夹环结构,适配体鸟嘌呤的 SERS 信号增加,可以准确检测湖水样中 LOD 值为 0.33 μM 。

1.4 研究目的与意义

食品作为人类赖以生存和社会发展不可或缺的物质基础，饮食结构趋于便捷化、多元化的同时，食品安全问题逐渐引起重视，其中动物源性食品安全问题占据重要部分，而持续性有机污染物是影响动物源性食品安全的重要因素之一。由于对人体健康存在较严重威胁，相关机构建立了一系列关于 PCBs 检测技术和残留指标。PCBs 的停产与防治已近半个世纪，但由于其本身强脂溶性，可通过生物蓄积而持续存在环境中^[20]。近年来世界各国对持续性有机污染物的监管越发严格，急需开发高灵敏度、快速的检测方法，免疫分析检测技术因简便灵敏、高通量、现场检测等优点成为仪器法的重要补充。针对多氯联苯单克隆抗体匮乏且同系物过多，本实验本文研究的主要内容如下：

1. 设计并合成半抗原，采用杂交瘤技术制备高灵敏、广谱型抗 PCBs 单克隆抗体并测定其相关性能。
2. 基于抗 PCBs 单克隆抗体，开发胶体金免疫层析技术进行快速检测。
3. 基于抗 PCBs 单克隆抗体和新型荧光材料（AIEgens），开发新的免疫试验，用于检测鸡肉中多氯联苯残留。

第二章 多氯联苯广谱型单克隆抗体的制备及其性能鉴定

2.1 引言

自 1975 年单克隆抗体技术开发以来, 单克隆抗体成为生物检测技术研发的首选目标, 免疫检测技术得到蓬勃发展。多氯联苯 (PCBs) 是由不同数量氯原子组成的苯环状芳香化合物, 2001 年 5 月作为持续性有机污染物 (POPs) 被列入《斯德哥尔摩公约》, 其中 7 种指示类 PCBs (编号 28、52、101、118、138、153 和 180) 和 12 种类二噁英类 PCBs (编号 77、81、105、114、118、123、126、156、157、167、169 和 189) 备受关注。目前关于抗 PCBs 单克隆抗体的报道相对匮乏, 由于 PCBs 常以混合物形式残留, 如何实现免疫学广谱检测成为难点。Chiu 等^[53]所筛选的单克隆抗体只能识别 PCB77 和 PCB126, 多数免疫学研究无法达到广谱识别 PCBs。本实验设计合成了 PCBs 半抗原及人工免疫原并采用杂交瘤技术筛选识别 PCBs 的单克隆细胞株, 建立 ic-ELISA 免疫检测方法并分析了该细胞株的灵敏度、亚型、交叉反应率等性能。

2.2 材料与方法

2.2.1 主要试剂和材料

表 2.1 主要试剂和试验材料

Table 2.1 Main reagents and test materials

试剂和试验材料	生产厂家
SP 2/0 (骨髓瘤细胞) 细胞	实验室自有
Balb/c 试验小白鼠	扬州大学比较医学中心
25 KD 透析袋	北京索莱宝科技有限公司
Protein G 柱	南京金斯瑞生物科技有限公司
胎牛血清	美国 Sigma 公司
弗式不完全佐剂	美国 Sigma 公司
弗式完全佐剂	美国 Sigma 公司
牛血清蛋白 BSA	美国 Sigma 公司
脱脂奶粉	北京索莱宝科技公司
RPMI Medium Modified 1640	美国 HyClone 公司
羊抗小鼠 IgG	北京索莱宝科技公司
HT 培养基添加剂 (50×)	美国 Sigma 公司
HAT 培养基 (50×)	美国 Sigma 公司
Tween-20	武汉博士德生物公司
青霉素 G、链霉素抗生素溶液	北京博奥龙免疫技术有限公司
PEG2000	美国 Sigma 公司

注：其他缓冲液所用化工试剂均购于广东西陇化工股份有限公司。

2.2.2 主要仪器设备

表 2.2 主要仪器设备

Table 2.2 Major instruments and equipment

仪器型号	生产厂家
Multiskan MK2 洗板机	美国 Thermo 公司
Multiskan FC 酶标仪	美国 Thermo 公司
Heracell VIOS 160i CO ₂ 培养箱	美国 Thermo 公司
台式高速离心机 5424R	德国 Eppendorf 公司
AIRTECH 超净工作台	苏州安泰空气有限公司
显微镜 LWD300-38HMC	德国 Hoffmann 公司
凝胶电泳成像分析仪	加拿大 Bio-Rad 公司
Milli-Q 净水器	美国 Millipore 公司
Nanodrop 2000	美国 Thermo 公司

2.2.3 缓冲液配方及细胞培养液

2.2.3.1 免疫实验所用缓冲溶液

1. 碳酸盐缓冲液 (CBS) pH=9.6: 2.93 g NaHCO₃, 1.59 g Na₂CO₃, 用 1 L 去离子水溶解, 振荡混匀, 密闭备用。
2. 磷酸盐缓冲液 (PBS) pH=7.4: 称 80 g NaCl, 2 g KCl, 29 g Na₂HPO₄·12H₂O, 2 g KH₂PO₄, 用 1 L 去离子水溶解, 超声混匀待用。
3. PBST 洗涤缓冲液: 取 100 mL 0.1 M PBS 缓冲液与 900 mL 双蒸水混合后加入 500 μL Tween-20, 混匀备用。
4. 3% MPBS 封闭液: 取 0.3 g 脱脂奶粉于 10 mL PBS 缓冲液, 振荡溶解, 备用 (按实验需要等比例配置)。
5. 5% DMSO-PBS 缓冲液: 以 10 mL 5% DMSO-PBS 缓冲液为例, 取 500 μL DMSO 加入到 9.5 mL PBS 中, 充分混匀待用。
6. 柠檬酸盐缓冲液 (CPBS) pH=5.5: 称 21 g 柠檬酸, 71.6 g Na₂HPO₄, 1 L 双蒸水充分溶解, 超声摇匀备用。
7. ELISA 显色液:

- a) 四甲基联苯胺(TMB)溶液: 称取 0.01 g 四甲基联苯胺溶于 1 mL DMSO 中, 混匀。
 - b) 0.65% H₂O₂ 溶液: 取 22 μL 30%的 H₂O₂ 溶液, 加入 978 μL 去离子水, 混匀。
 - c) 显色液: 取 100 μL TMB 溶液, 25 μL 0.65% H₂O₂ 溶液, 加入到 10 mL 的 CPBS 缓冲液中, 振荡混匀。
8. 2 M H₂SO₄ 终止液: 以配制 1 L 体积溶液为例, 将 110 mL 浓硫酸缓慢逐滴加入 890 mL 去离子水中, 室温冷却备用。

2.2.3.2 单克隆抗体制备所需缓冲液的配制

细胞培养基:

1. 不完全 1640 培养基: 将 100 mL 胎牛血清置于室温融化, 56°C 灭活 0.5 h; ② 称取 0.5 g 碳酸氢钠、0.15 g L-谷氨酰胺、1.2 g HEPES、0.05 g 丙酮酸钠加入融化的 5 mL 青霉素 G、链霉素溶液中至溶解。过滤膜后加入到 500 mL 的 RPMI 1640 中混匀。
2. 完全 1640 培养基: 将胎牛血清与不完全 1640 培养基 (1:4, v:v) 混匀。
3. HAT 培养基: 将 500 μL HAT 培养基添加剂加入 50 mL 完全 1640 培养基中。
4. HT 培养基: 将 1 mL HT 培养基添加剂加入到 49 mL 完全 1640 培养基中。

2.2.3.3 蛋白纯化缓冲液

结合缓冲液:

1. A 液: 称取 3.12 g 的 NaH₂PO₄·2H₂O 加入 100 mL 去离子水;
2. B 液: 称取 14.34 g 的 Na₂HPO₄·12H₂O 溶解于 200 mL;
3. 取 78 mL A 液与 122 mL B 液充分混匀, 用双蒸水将混合液稀释 10 倍, 得到 20 mM 磷酸钠缓冲液, 调 pH 至 7.0, 即为结合缓冲液。

洗脱缓冲液: 量取 200 mL 双蒸水溶解 3.028 g 甘氨酸, 得到 0.2 M 的甘氨酸溶液用盐酸调 pH 至 2.7, 再稀释 1 倍, 即为洗脱缓冲液。

Tris-HCl 平衡缓冲液: 量取 300 mL 双蒸水溶解 60.55 g 的 Tris, 用 HCl 调节 pH 至 9.0, 并定容 500 mL, 即为 1 M 的 Tris-HCl 平衡缓冲液。

乙酸-乙酸钠缓冲液: 1.2 mL 乙酸加到 100 mL 0.06 M 乙酸钠溶液中 (60 mmol, pH 4.0)。

2.2.3.4 透析袋的处理

为了纯化偶联后的包被原与免疫原，需进行透析，具体方案如下：将透析袋（8-15 KDa）剪成 10-20 cm 的小段，放入装有 1 mM EDTA- Na_2 、2%（W/V） NaHCO_3 的 500 mL 蒸馏水中，煮沸，边煮边搅拌 5 min，蒸馏水清洗透析袋，除去增塑剂，再次用蒸馏水煮沸 5 min 并清洗后 4°C 贮存于 20% 酒精中待用^[65]。

2.2.4 半抗原的合成

多氯联苯半抗原 a、b、c 的合成思路是引入带有羧基的碳链取代多氯联苯苯环上的 Cl。

PCBa 合成路线如图 2.1 所示。将 K_2CO_3 （9.2 g，66.6 mmol）添加到溶解于 25 mL DMF 的化合物 1（5.0 g，25.2 mmol）中，然后添加化合物 2（6.5 g，33.2 mmol）。室温下搅拌 16 h。于 50 mL 双蒸水中用 PE（3*100 mL）萃取。去除有机相， Na_2SO_4 干燥。利用硅胶柱（PE/EA=10/1）纯化，得到无色油状纯化合物 3（5.1g，产率：64.6%）。

将化合物 3（2.0 g，6.4 mmol）、 NaOH （1.0 g，25.7 mmol）和 H_2O （8 mL）混合于甲醇（20 mL，64.2 mmol）中搅拌（60°C，2 h）。1 M HCl 溶液调节 pH 至 3，用水洗涤并真空干燥，得到白色固体形式的 PCBa（1.7 g，产率：93.4%）。

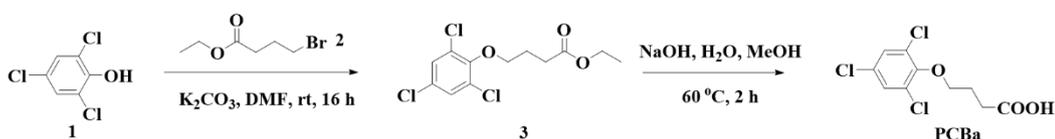


图 2.1 半抗原 PCBa 合成路线

Fig. 2.1 Synthesis route of haptene PCBa

PCBb 合成路线如图 2.2 所示。10°C 下将化合物 1（4.00 g，1.01 mmol）添加到含有 HNO_3 （1.60 g，1.31 mmol）和 H_2SO_4 （4.00 g，2.02 mmol）的溶液中，并添加 1,2-二氯乙烷。搅拌（50°C，10 h）。冰水淬灭，提取到 EtOAc（3*100 mL）中。去除有机相， Na_2SO_4 干燥，减压浓缩，化合物 2 为淡黄色固体（5.10 g，75%）。

将化合物 2（5.10 g，19.6 mmol）转入含有乙醇（40 mL）和水（8 mL）混合溶液中，添加 Fe（8.80 g，0.157 mol）和 NH_4Cl （3.13 g，0.059 mol）。氮吹，搅拌（80°C，5 h），过滤沉淀。取滤液用水稀释并提取到 EtOAc（3*100 mL）和水

(50 mL) 中。去除有机相，干燥，浓缩。残渣通过二氧化硅过滤纯化，乙酸乙酯/石油醚洗脱，获得黄色固体形式化合物 3 (4.50 g, 91%)。

向化合物 3 (2.50 g, 10.9 mmol) 中添加 57% 的稀硫酸 (20 mL, 3M)、碘化铜 (1.98 g) 和碘化钾 (1.60 g) 水溶液。30°C 水浴，逐滴添加亚硝酸钠 (1.74 g) 水溶液 (4 mL)，重复搅拌 10 min。将混合物在 25°C 下搅拌 5 h。添加亚硫酸钠淬灭并过滤。将反应物提取到 EtOAc (3*100 mL) 中。Na₂SO₄ 干燥，浓缩。化合物 4 为浅白色固体 (3.20 g, 89%)。

将化合物 5 (500 mg, 1.41 mmol)、化合物 6 (430 mg, 3.41 mmol) 溶解在二氧六环 (25 mL) 中，添加醋酸钾 (210 mg, 1.09 mmol) 和 pd (dppf) Cl₂ (110 mg, 0.143 mmol)，氮气保护，100°C 下加热 12 h。反应结束后冷却至室温，过滤沉淀。用水稀释滤液并将其提取到 EtOAc (3*20 mL) 中，干燥洗净。残渣通过二氧化硅过滤纯化，乙酸乙酯/石油醚洗脱，得到所需化合物 7 (400 mg, 70.4%)

将化合物 7 (500 mg, 1.24 mmol)、化合物 4 (422 mg, 1.24 mmol) 溶解于二氧六环 (20 mL) 和 H₂O (4 mL)，添加碳酸氢钠 (274 mg, 5.43 mmol) 和 pd (dppf) Cl₂ (96.0 mg, 0.0155 mmol)。氮吹 (100°C, 12 h)。冷却过滤。取滤液并将其提取到 EtOAc (3*20 mL) 中。洗涤、干燥、洗脱，得到白色固体化合物 8 (500 mg, 81.8%)。

将化合物 8 (420 mg, 0.61 mmol) 溶解于 EtOH (8 mL) 和 H₂O (2 mL) 中，添加氢氧化锂 (45 mg, 1.88 mmol)，氮气保护 (60°C, 5 h)。用稀硫酸将反应溶液 PH 调节至 3，然后将混合物萃取至 EtOAc (3*20 mL) 中。洗涤、干燥，得到粗产品。残渣通过异丙醇晶进一步纯化，得到白色固体 PCBb (350 mg, 88%)。

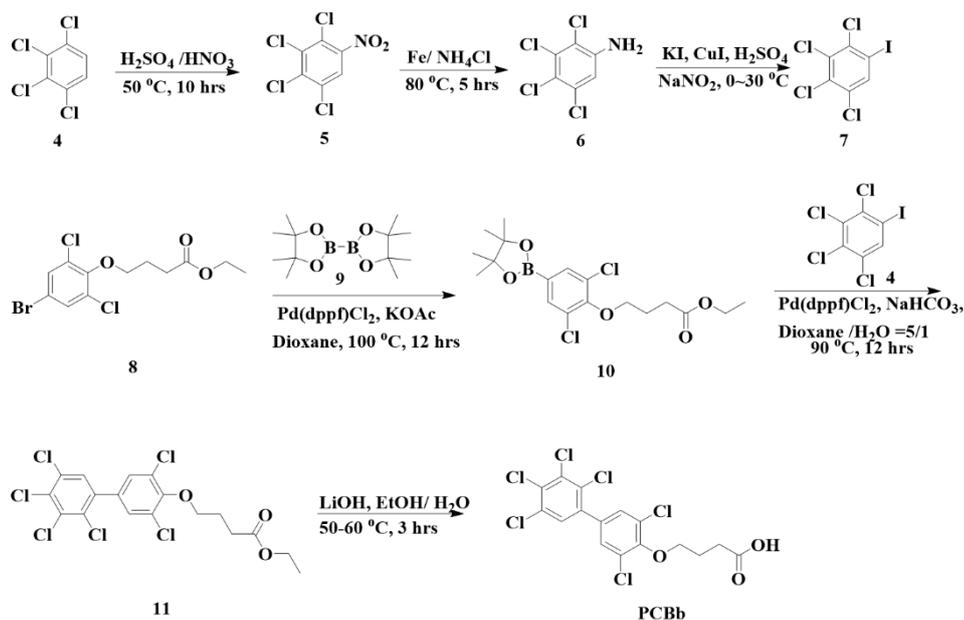


图 2.2 半抗原 PCBb 的合成路线

Fig. 2.2 Synthetic routes of hapten PCBb

PCBc 合成路线如图 2.3 所示。化合物 1 (5.0 g, 20.7 mmol) 和化合物 2 (4.0 g, 20.7 mmol) 溶解于 DMF (25 mL), 添加 K_2CO_3 (5.7 g, 41.3 mmol) 后搅拌 (25°C, 5 h)。倒入水中 (50 mL), 用 EtOAc (2*100 mL) 萃取。洗涤, Na_2SO_4 干燥, 得到化合物 3 (6.1g, 收率 82.8%)。

将化合物 3 (2.0 g, 5.6 mmol)、化合物 4 (1.6 g, 8.4 mmol)、 K_2CO_3 (2.0 g, 14.5 mmol) 和 $Pd(dppf)Cl_2$ (411 mg, 0.56 mmol) 溶解在二氧六环/ H_2O (25 mL/5 mL) 中, 80°C 下 N_2 保护搅拌 2 h。倒入水中 (50 mL), EA (2*50 mL) 提取。洗涤, 干燥。硅胶柱 (PE/EA=10/1) 纯化, 得到化合物 5 (2.2 g, 产率: 92.8%)。

将化合物 5 (1.0 g, 2.4 mmol) 溶解在 MeOH/ H_2O (10 mL/2 mL) 中, 添加 NaOH (384 mg, 9.6 mmol)。60°C 搅拌 2 h。然后将混合物倒入水中 (20 mL), 用 1 M HCl 酸化至 pH 值为 3, 过滤。用水洗涤湿滤饼并在真空中干燥, 得到白色固体的纯化合物 6 (600 mg, 产率: 64.2%)。

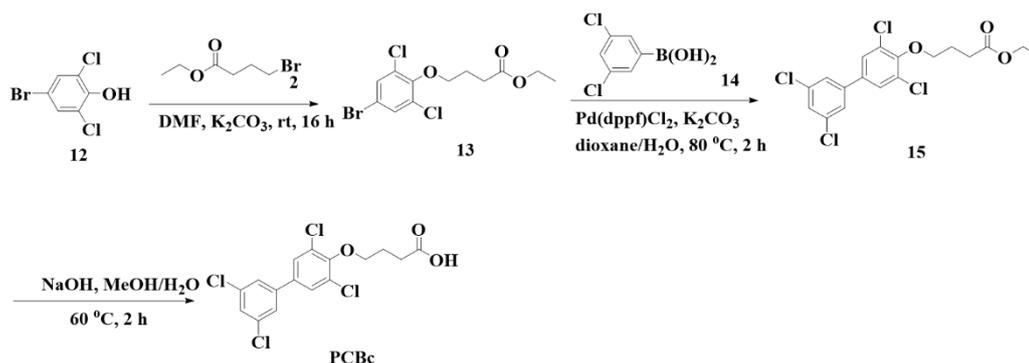


图 2.3 半抗原 PCBc 的合成路线

Fig. 2.3 Synthetic route of haptin PCBc

2.2.5 人工抗原的偶联

为获取高灵敏度，建立以 PCBa-OVA 作为包被原的异源 ic-ELISA。采用活泼酯法^[66]，合成途径如图 2.4，合成方案如下：将 PCBa (0.05 mmol, 14.20 mg) 与 NHS (0.01 mmol, 11.5 mg) 和 DCC (0.02 mmol, 2.06 mg) 溶解于 1 mL *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 中，避光搅拌 12 h。10000 g 离心，将上清液逐滴加入到 5 mL 含有 0.1 μmol OVA 的磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.01 M, pH 7.4) 中。室温搅拌 6 h，10000 g 离心，取上清。使用 14000 Da 透析袋进行透析。首先用超纯水透析一天，再用 PBS (0.01 M, pH 7.4) 透析 3 天，间隔 5-8 h 换一次液，得到人工抗原，分装，-20°C 保存。

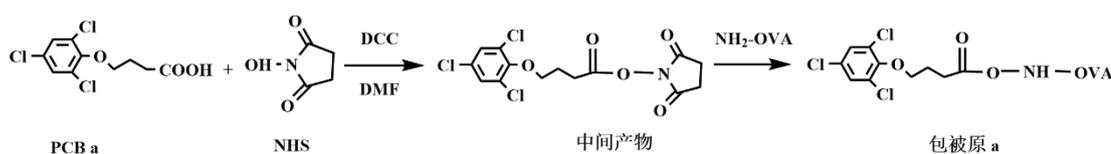


图 2.4 人工抗原 a 的合成方案

Fig. 2.4 Synthetic scheme of artificial antigen a

人工抗原 b 的合成途径如图 2.5 所示，采用活泼酯法，合成方案同上。偶联结束，进行透析，紫外与飞行质谱鉴定。

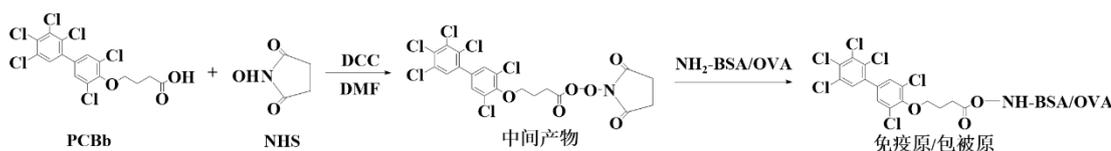


图 2.5 人工抗原 b 的合成方案

Fig. 2.5 Synthetic scheme of artificial antigen b

人工抗原 c 的合成途径如图 2.6 所示,同样采用 EDC、NHS 作为偶联活化剂,合成方案同上。PCBc-KLH 作为免疫原, PCBc-BSA 作为包被原。

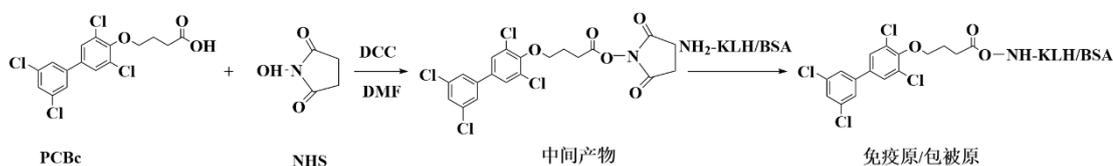


图 2.6 人工抗原 c 的合成方案

Fig. 2.6 Synthetic scheme of artificial antigen c

鉴定是否偶联成功:对半抗原、蛋白和偶联物进行紫外(200-400 nm)扫描,分别将半抗原、蛋白以及偶联物稀释到 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,根据紫外吸收光谱图来判断^[67],同时利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪对 PCBb-BSA 进行表征。

利用紫外吸收光谱扫描包被原和免疫原,将得到的数值用以下公式计算结合比^[68]:

$$\frac{C_a}{C_b} = \frac{AC_{am} * KB_{bm} - AC_{bm} * KB_{am}}{AC_{bm} * KB_{am} - AC_{am} * KA_{bm}}$$

C_a/C_b 为人工抗原中半抗原与载体蛋白的结合比; AC_{am} 、 AC_{bm} 为偶联物分别在半抗原和载体蛋白最大吸收波长处的吸光值; KB_{am} 、 KB_{bm} 为载体蛋白分别在半抗原和载体蛋白最大吸收波长处的摩尔消光系数; KA_{am} 、 KA_{bm} 为半抗原分别在半抗原和载体蛋白最大吸收波长处的摩尔消光系数。

2.2.6 小鼠免疫过程

2.2.6.1 免疫方案

购买 30 只 5-6 周龄 Balb/c 雌性小白鼠,饲养 2 周,从小鼠尾部采取 20 μL 静脉血,静置离心获得阴性血清作为后续试验对照。用不同剂量的偶联物 PCBb-BSA 和 PCBc-KLH 分别免疫小白鼠,将免疫原终浓度稀释至 1 mg/mL ,与弗氏佐剂混合(1:1, v:v),采用乳化器来回推动大概 15 min 使其充分乳化(免疫原滴加到佐剂中更易乳化),形成油包水乳液(滴在水面不扩散)表示乳化完成。具体免疫、采血方案如下:

表 2.3 多氯联苯免疫、采血方案

Table 2.3 Immunization and blood collection plan of polychlorinated biphenyls

免疫或采血时间	佐剂	免疫剂量	免疫部位
一免（第 2 天）	氟式完全佐剂	25、50、75 μg /只	腹腔
二免（第 16 天）	氟式不完全佐剂	25、50、75 μg /只	腹腔
三免（第 30 天）	氟式不完全佐剂	25、50、75 μg /只	腹腔
四免（第 44 天）	氟式不完全佐剂	25、50、75 μg /只	腹腔
五免（第 58 天）	氟式不完全佐剂	25、50、75 μg /只	腹腔
冲免（第 72 天）	生理盐水	50、100、150 μg /只	腹腔
融合	—	—	取脾脏

注：第三次免疫以后，在每次免疫后的第 7 天进行小鼠尾部采血测评。

2.2.6.2 免疫过程血清性能测定

通过间接非竞争 ELISA 测定小鼠血清中抗体效价，效价是指在 450 nm 处吸光度为 1.0 的抗血清的稀释倍数。将待检血清、阴性对照血清从 500 倍开始做 2 倍的梯度稀释，选择吸光度（OD 值）在 1.0 附近相应的稀释倍数。然后用间接竞争 ELISA 测定血清中抗体对多氯联苯的识别性能，判定是否对 PCBs 有特异性结合。选择效价较高、对 PCBs 识别效果最好的小鼠脾脏进行细胞融合。

间接非竞争 ELISA 法实验方案：

1. 包被：用 CBS 缓冲液稀释包被原，100 μL 每孔加入酶标板中，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 2 h。
2. 洗涤：弃掉包被液，PBST 洗涤酶标板 3 次（220 μL /孔）吸水纸拍干。
3. 封闭：加入 3% MPBS 封闭溶液（200 μL /孔），于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 2 h；洗涤同步步骤 2。

4. 加样：将尾血血清从 500 倍开始倍比稀释 6-8 个浓度梯度，各梯度设置三个平行。
5. 空白对照为 PBS，阴性对照为免疫前的尾血血清，50 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 1 h。洗涤同步骤 2
6. 加酶标二抗：酶标二抗用 PBS 缓冲液稀释 5000 倍并混匀，100 μL /孔于酶标板中并孵育（37 $^{\circ}\text{C}$ ，1 h）；洗涤：同步骤 2 且增加 2 次洗涤。
7. 显色：加入配制好的 TMB 显色液（100 μL /孔），37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min。
8. 终止反应：加入 2 M H_2SO_4 （50 μL /孔）终止显色，立即在酶标仪上读取 OD₄₅₀ 值。

间接竞争 ELISA 法是在间接非竞争 ELISA 的基础上，在加样时需每孔同时加 50 μL 小鼠血清和 50 μL 对应浓度的 PCBs 标准品溶液，其中 PCBs 用 5% DMSO-PBS 混合溶液稀释。阴性对照孔装有 50 μL 血清和 50 μL 5% DMSO-PBS 混合溶液，同时空白对照孔装有 50 μL PBS 和 50 μL 5% DMSO-PBS 混合溶液。空白对照有效，与阴性 OD₄₅₀ 值相比，阳性对照值下降最显著的血清即竞争抑制作用最好。按照免疫方案加强免疫，最终选择对应的小鼠作为细胞融合材料。

2.2.7 杂交瘤细胞融合与筛选

2.2.7.1 骨髓瘤细胞 SP 2/0 的复苏及培养

细胞融合的重要前提是具有良好状态的骨髓瘤细胞，首先将其复苏，操作步骤如下：

1. 将冻存于液氮罐中的 SP 2/0 骨髓瘤细胞取出并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴融化，转入 15 mL 细胞专用离心管，立即离心（1000 g，7 min）。
2. 离心后，弃上清，完全 1640 培养基吹打使其悬浮，转入细胞培养瓶，且控制溶液体积在 5 mL 左右，于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培养箱中。24 h 后，观察细胞状况（细胞大小均一、浑圆透亮即可进行细胞融合）。
3. 传代：待细胞长满培养瓶底部面积 2/3 时即可传代。首先弃去瓶中液体，用 2 mL 37 $^{\circ}\text{C}$ 完全 1640 培养基吹洗干净附着在细胞瓶底部的细胞，移取 1 mL 到一个新的培养瓶中培养，待细胞长满再重复以上操作。扩大培养至 6-7 瓶以备细胞融合使用，另外保留 1-2 瓶冻存。

2.2.7.2 饲养细胞的制备

首先采用颈椎脱臼处死空白 Balb/c 小鼠，将其浸泡于 75% 酒精中 10 min，随即放进超净台培养皿中；用镊子提起腹部，剪开最外层皮毛露出腹膜，注射 5 mL HAT 培养基，轻微晃动获取体内微环境；用注射器抽回腹腔内的液体到无菌培养皿中，添加 60 mL 培养基混匀；分铺到 6 块 96 孔细胞培养板（100 μ L/孔），用医用胶带封边，置于 37°C，5% CO₂ 培养箱，24 h 之后显微镜观察饲养细胞是否有污染。

2.2.7.3 脾细胞制备

选择效价和抑制率最高的小鼠，颈椎脱臼处死，眼球取血作为筛选杂交瘤细胞时的阳性对照；浸没在 75% 的酒精中（10 min），随即固定于解剖盘上，小鼠脾脏位于腹部左上方位，将其摘除并分离周围的脂肪组织；将 200 目不锈钢网筛浸入装有 20 mL 不完全 1640 培养基的无菌培养皿中，利用注射器胶塞将脾脏细胞轻轻按压研磨，释放细胞，至脾脏泛白；转移至 50 mL 离心管定容 20 mL 并用胶头滴管将细胞吹散，若脾细胞上清液中脂肪颗粒较多，离心重悬；细胞计数板计数，放于培养箱中待用。

2.2.7.4 细胞融合

参考相关研究并稍做修改^[69]，具体操作步骤如下：

1. 选择状态良好、形态大小均匀的 SP 2/0 细胞（3-4 瓶）转移到装有 20 mL 不完全 1640 培养基的 50 mL 离心管中，同 2.2.7.3 中得到的脾细胞离心（1000 g，10 min）。弃上清，重悬后，将脾细胞和 SP 2/0 细胞以 5:1-10:1 的比例混合，加入不完全 1640 至 30 mL，离心（3000 g，10 min），弃上清，轻轻敲击使其分散混匀。
2. 融合温度控制在 40°C 水浴的烧杯中，将 1 mL 50% PEG，贴壁先慢后快逐滴加入到混合细胞中，与此同时轻轻摇晃，1 min 内加完，且静置 1 min；再用 15 mL 不完全 1640 培养基终止 PEG 反应，先慢后快 5 min 内加完，然后在培养箱中静置 10 min。
3. 离心去上清（800 rpm，8 min），加入 5 mL HAT 培养基吹打重悬融合细胞并定容 60 mL 摇匀，加入含有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中，37°C 培养箱

中孵育。融合 24 h 后, 观察融合细胞是否污染; 72 h 后观察细胞长势及培养基颜色若澄清则尽量减少移动继续培养。

4. 通常融合后根据细胞状态每间隔 3-5 d 进行 HAT 半换液, 待融合细胞适应生长三周后改用 HT 培养基 2-3 d 换一次液, 一周后转换成完全 1640 培养基。观察细胞, 待细胞长满 96 孔细胞培养板板底面积的 1/3, 计数并记录对应细胞板中的细胞株数及长势。
5. 利用 ELISA 法检测细胞上清, 筛选阳性细胞株。间接非竞争 ELISA 法用于初筛 (参考 2.6.2.2), 细胞上清为抗体, 阴性对照为 SP 2/0 细胞上清液和未做融合的脾细胞上清液, 阳性对照为融合前的眼血血清, 空白对照为 PBS 缓冲液。选择 OD₄₅₀ 值高的细胞上清, 采用间接竞争 ELISA 法与 PCBs 做竞争, 有明显竞争抑制作用的即为阳性杂交瘤细胞孔 (以 P/N \geq 2.1 为判定标准)。

2.2.7.5 亚克隆

经测量挑选出阳性杂交瘤细胞孔后, 显微镜观察孔内细胞个数, 采用有限稀释方法进行亚克隆。具体操作如下:

轻轻吹打阳性杂交瘤细胞孔使贴壁细胞呈细胞悬液, 取 10 μ L 滴入细胞计数板进行计数。倍比稀释后定容到 10 mL, 均匀分散接种到新的 96 孔培养板中 (100 μ L/孔), 每孔理论细胞个数为 1; 然后封盖培养 3-5 d, 观察细胞长势, 大概在第 3 d, 标注孔内细胞株团数目及个数, 吸取细胞上清进行 ELISA 检测 (参考步骤 2.6.2.2), 挑出 OD₄₅₀ 值及竞争抑制较好的孔。重复以上步骤, 筛选至 96 孔培养板内细胞株均为阳性, 即为阳性杂交瘤细胞单株。定株后转至 6 孔板和细胞培养瓶扩大培养。当细胞铺满培养瓶, 弃去上清液, 用 1 mL 完全 1640 培养基轻轻吹起形成细胞悬液, 将细胞悬液和 DMSO 按 9: 1 进行混合, 缓慢加至冻存管中, 封口, 标记。冻存管依次放于 4 $^{\circ}$ C (1 h), -20 $^{\circ}$ C (1 h), -80 $^{\circ}$ C 过夜。最后于液氮中保存。

2.2.8 单克隆抗体的制备与性能鉴定

2.2.8.1 小鼠腹水制备

选取 BA1B/c 经产雌鼠 (5-10 只), 注射氟氏不完全佐剂腹腔致敏 (500 μ L/只), 缓慢轻揉腹部 2 min。3 d 后, 每只小鼠腹腔注射杂交瘤细胞 (2×10^6 个);

7-10 d 后, 小鼠腹腔明显肿胀且行动迟缓, 用 10 mL 的注射器针头插入小鼠腹部收集腹水, 离心 (3000 rpm, 10 min) 去除脂肪层取上清液, -20°C 保存; 继续观察小鼠, 待腹部再次积聚腹水, 每只小白鼠采集 2~3 次, 收集方法同上。

2.2.8.2 腹水单抗的纯化

辛酸硫酸铵沉淀法粗提纯^[70]: 往 1 mL 腹水中加入 3 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液, 0.1 M 调节 pH 至 4.5。缓慢滴加正辛酸 (30 μ L) 室温下持续搅拌 30 min, 静置离心 (10000 rpm, 30 min) 取上清, 用 PBS (0.1 M, pH=7.4) 10 倍稀释且 5 M NaOH 调节 pH 至 7.4, 4°C 预冷 15 min; 按 0.277 g/mL 加入硫酸铵粉末 (若液体浑浊度不够补加少量硫酸铵), 加完后继续搅拌 30 min, 离心 (5000 rpm, 15 min) 取沉淀。将沉淀溶于少量 PBS (0.01 M, pH=7.4), 4°C 透析 3 d 得到的粗提纯抗体, -20°C 保存。

Protein G 柱纯化抗体^[71]:

预处理: ①将粗提纯腹水用结合缓冲液稀释 5 倍且用 0.45 μ m 的滤膜过滤; ②Protein G 柱子: 5 mL 的结合缓冲液清洗柱子。

1. 结合: 将预处理的腹水按 1 mL/min 的流速上样, 重复 3 次;
2. 洗脱: 用 5 倍柱体积洗脱缓冲液洗脱, 收集于 1.5 mL 的离心管中, 每管收集 1 mL, 按收集顺序依次编号;
3. 中和: 每 1 mL 洗脱样品中加入 40 μ L Tris-HCl (pH=9.0) 平衡缓冲液, 调节 pH 至中性;
4. 柱子的再生与清洗: 洗脱结束后, 用结合缓冲液平衡 pH, 再用超纯水清洗, 最后用 20% 乙醇封柱, 组装好 4°C 保存;
5. 抗体纯化完成, SDS-PAGE 电泳分析抗体纯化效果。
6. 透析: 用 PBS 透析 3 天, 并用 NanoDrop 按编号依次测量样品浓度。

2.2.8.3 抗体纯度与亚型鉴定

SDS-PAGE 电泳步骤^[72]:

1. 待测样品预处理: 将纯化后抗体与 4 \times 蛋白上样缓冲液混合 (v:v, 3:1) 均匀 (此时抗体浓度约为 200 μ g/mL), 于沸水中煮沸 5 min。将 10% 蛋白预制胶装入电泳槽并固定, 加入足量电泳缓冲液;

2. 上样：按泳道编号依次加入 4 μL 250 KD 的蛋白 Marker，10 μL 预处理后的样品；接通电泳仪，打开电源（140 V 恒压，60 min）；
3. 染色：当样品跑至蛋白胶底部，关闭电源，拆下电泳板，取出凝胶加水冲洗干净，加入考马斯亮蓝染色 4 h 即可。

亚型鉴定：本实验采用鼠单克隆抗体亚型试剂盒进行鉴定。最后测量 OD_{450} 值，值最高的那个阳性孔所对应的亚型即为单抗所属抗体亚型。

2.2.8.4 单克隆抗体性能鉴定

通过棋盘法选择最佳工作浓度，采用间接竞争 ELISA 法测定酶标板中每孔的吸光度 B，并设置空白对照孔及阴性对照孔 B_0 ，以抑制率 (B/B_0) 为纵坐标，PCB 半抗原以及其他同系物浓度的对数值为横坐标进行参数拟合，得到 IC_{50} ，即该单克隆抗体的灵敏度。抗体特异性以交叉反应率来表征。采用 ic-ELISA 法测定不同同系物的 IC_{50} ，并计算交叉反应率 $(\text{CR}\% = \text{IC}_{50}(\text{半抗原}) / \text{IC}_{50}(\text{同系物}) \times 100\%)$ 。

2.2.9 抗体与分子模拟对接

抗体基因序列委托泰州市百英生物科技有限公司测量。

模拟对接：首先利用 Gaussview5.0 画出半抗原 PCBc 的化学结构式并利用 Open Babel GUI 转为“pdb”格式；打开 SWISS-MODEL 同源建模得到抗体蛋白结构导出为“pdb”格式；利用 AutoDock 加“H”并将抗体与半抗原分别选为 Grid(受体分子)与 Ligand(配体)存为“pdbqt”格式。点击“Macromolecule”打开抗体模型，点击“Setmap Types”打开小分子模型。然后选择“Grid box”，调整坐标轴包裹整个抗体模型保存相关参数为 Vina config (config. txt) 然后利用 AutoDock vina 进行对接，分析，选取能量最低的构象保存为 pdb 格式并使用 PyMOL 查看对接结果^[73]。选择以复合物形式输出为 pdb 格式，用 Discovery 打开查看分子间作用力 (Ligand Interactions)，其他 PCBs 同系物化学结构式从 PubChem 或者 ZINC 网站下载按照以上步骤进行处理。

2.3 结果

2.3.1 半抗原合成鉴定

根据目标物化学结构以及免疫学实验规则,合成含有所有分析物共同结构的通用结构的半抗原是获得广谱型特异性单克隆抗体的关键步骤^[74]。由于相对分子质量小于 10 KDa 无法引起机体免疫应答,所以半抗原需具备能与载体蛋白共价结合的活性基团与一定长度的连接臂,一般为 3-6 个长度碳链以暴露分子结构提高免疫原性。本实验以 PCBs 同系物为母体从低氯到高氯设计并合成了三个半抗原为 PCBa、PCBb 和 PCBc。PCBa 是通过在 2,4,6-三氯取代基上延伸羧基碳链合成的; PCBb 是由 2,3,3',4,4',5,5'-七氯联苯通过延伸羧基碳链进行合成; 同样, PCBc 由 3,3',5,5'-四氯联苯和对位羧基碳链组成。半抗原的合成结果如下。

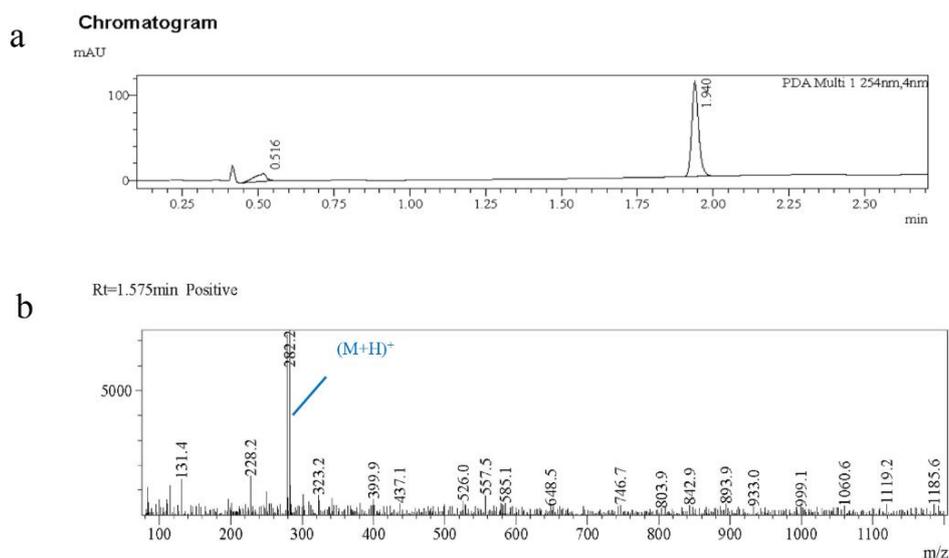


图 2.7 PCBa 液相色谱质谱鉴定

Fig. 2.7 Identification of PCBa by liquid chromatography mass spectrometry

PCBa 合成产率为 93.4%, 分子式为 $C_{10}H_9O_3Cl_3$, 相对分子质量为 283.5, 根据液相色谱质谱鉴定 (图 2.7) 结果: 保留时间在 1.94 min; m/z 282.3 ($M+H^+$)。

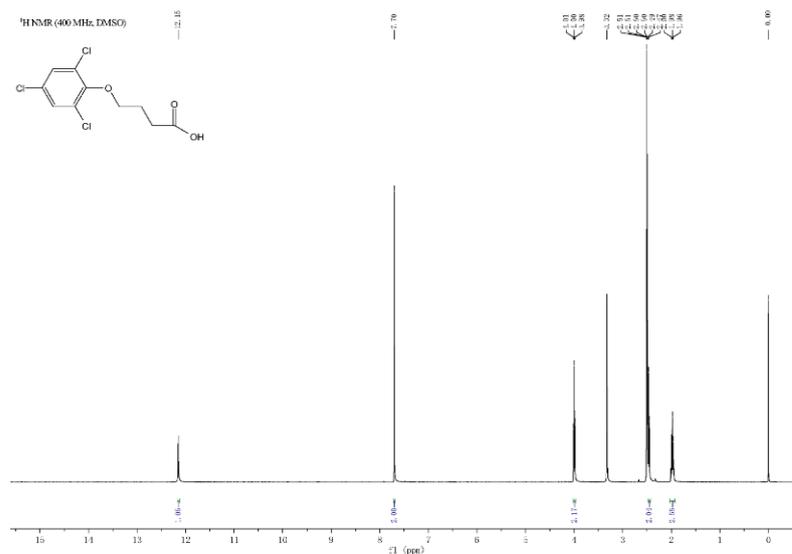


图 2.8 PCBa 核磁共振谱图

Fig. 2.8 Nuclear Magnetic Resonance spectrum of PCBa

核磁谱解析结果（图 2.8）： ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.15 (s, 1H), 7.70 (s, 2H), 3.99 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.46 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H) and 1.98 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H), 表明羧基成功偶联到母体化合物。

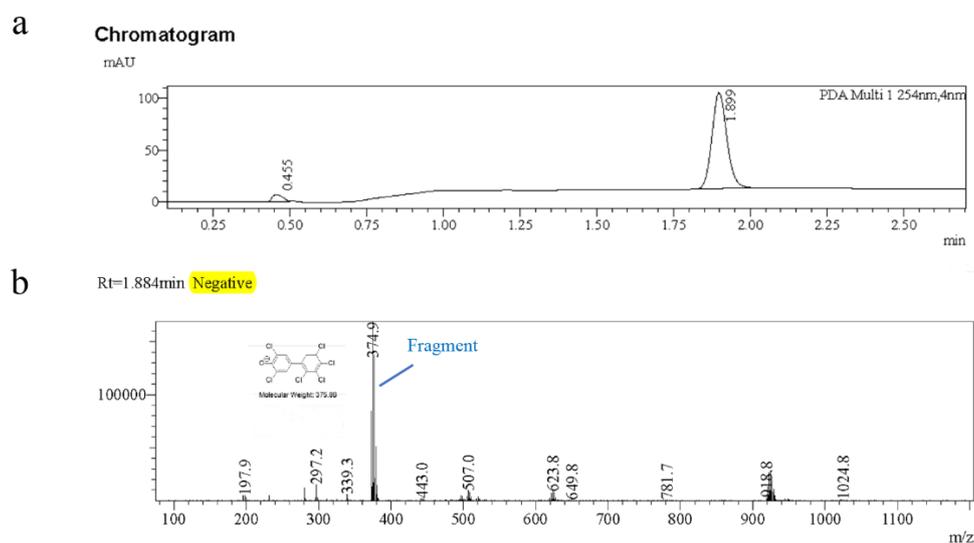


图 2.9 PCBb 液相色谱质谱鉴定

Fig. 2.9 Identification of PCBb by liquid chromatography mass spectrometry

PCBb 合成产率为 88%，分子式 $C_{16}H_{10}O_3Cl_6$ ，相对分子质量为 463，液相色谱质谱结果表明保留时间为 1.90 min，将其碎片处理，质谱结果 m/z 374.9 (Fragment).

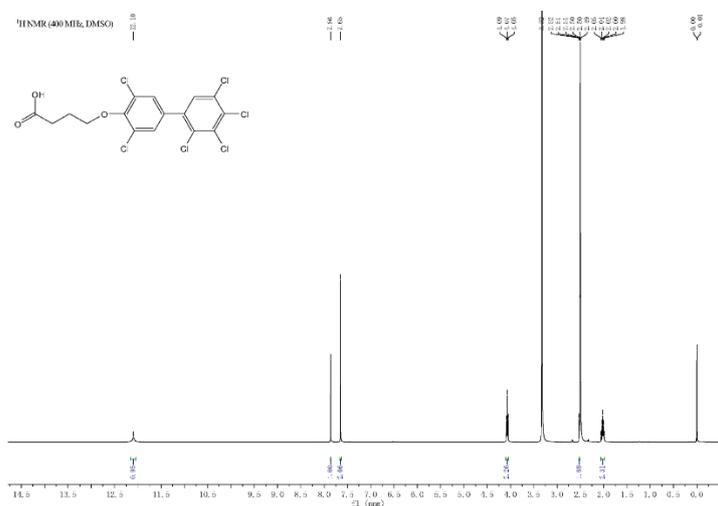


图 2.10 PCBb 核磁共振谱图

Fig. 2.10 Nuclear Magnetic Resonance spectrum of PCBb

核磁谱解析结果（图 2.10） 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.10 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.65 (s, 2H), 4.07 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), and 2.55-2.50 (m, 2H), 2.05-1.98 (m, 2H)。表明母体化合物与羧基合成成功。

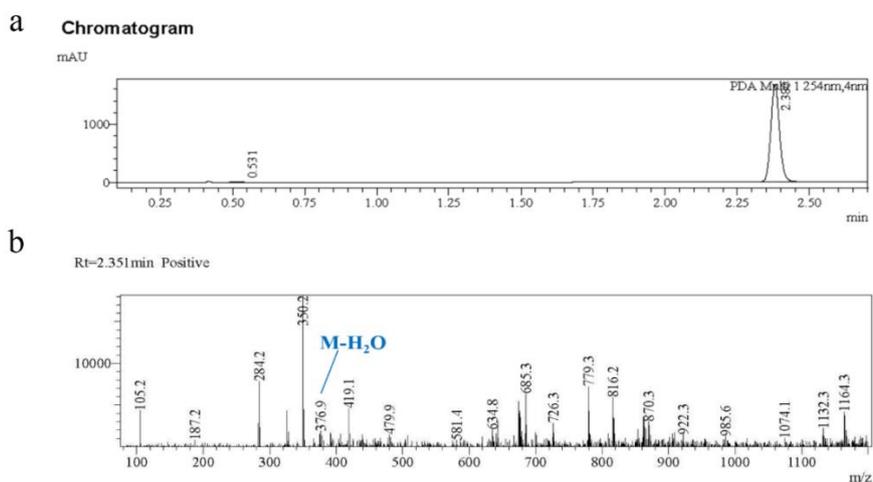


图 2.11 PCBc 液相色谱质谱鉴定

Fig. 2.11 Identification of PCBc by liquid chromatography mass spectrometry

PCBc 合成产率为 62.4%，分子式 $C_{16}H_{12}O_3Cl_4$ ，相对分子质量为 394，液相色谱质谱结果如下：RT=2.38 min， m/z 376.9 (M-H₂O)

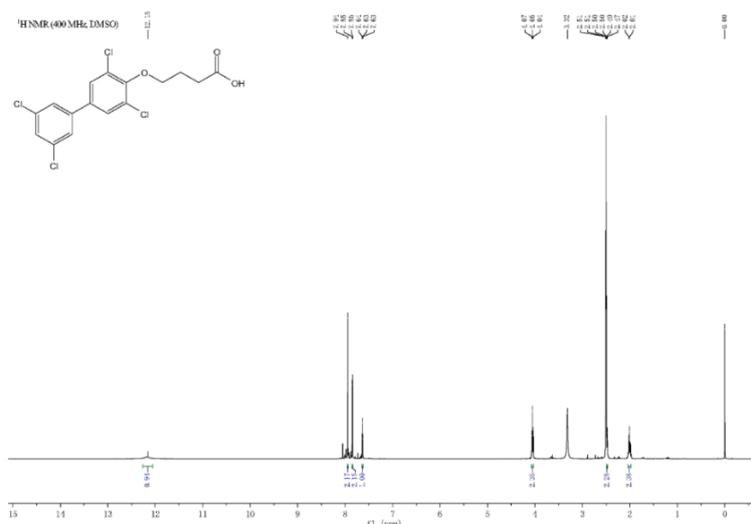


图 2.12 PCBc 核磁共振谱图

Fig. 2.12 Nuclear Magnetic Resonance spectrum of PCBc

核磁谱解析结果（图 2.12）： 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.15 (s, 1H), 7.94 (s, 2H), 7.85 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H), 7.63 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H), 4.05 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.47 (m, 2H), and 2.02 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H)，表明 PCBc 合成成功。

2.3.2 人工抗原偶联鉴定

单个半抗原小分子，相对分子量低于 10000 Da，不具有诱导免疫反应的免疫原性；因此，它需要与载体蛋白偶联。偶联结果，采用紫外光谱（200-400 nm）扫描多氯联苯半抗原，载体蛋白 BSA、OVA、KLH 以及对应的人工抗原。

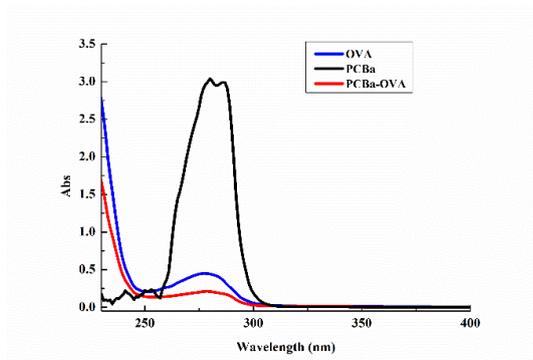


图 2.13 PCBa 包被原紫外光谱图

Fig. 2.13 Ultraviolet spectrum of PCBa-OVA

为了提高灵敏度,采用异源包被,所以 PCBa 作为包被原与其他两个免疫原进行试验。由图 2.13 可知,PCBa-OVA 最大吸收峰 280 nm 介于半抗原的最大吸收峰波长 286 nm 和载体蛋白 OVA 的最大吸收峰波长 278 nm 之间,吸收峰波长发生偏移,表明偶联成功。且通过朗伯-比尔定律等相关公式计算可得半抗原与载体蛋白偶联摩尔比为 23.2:1。

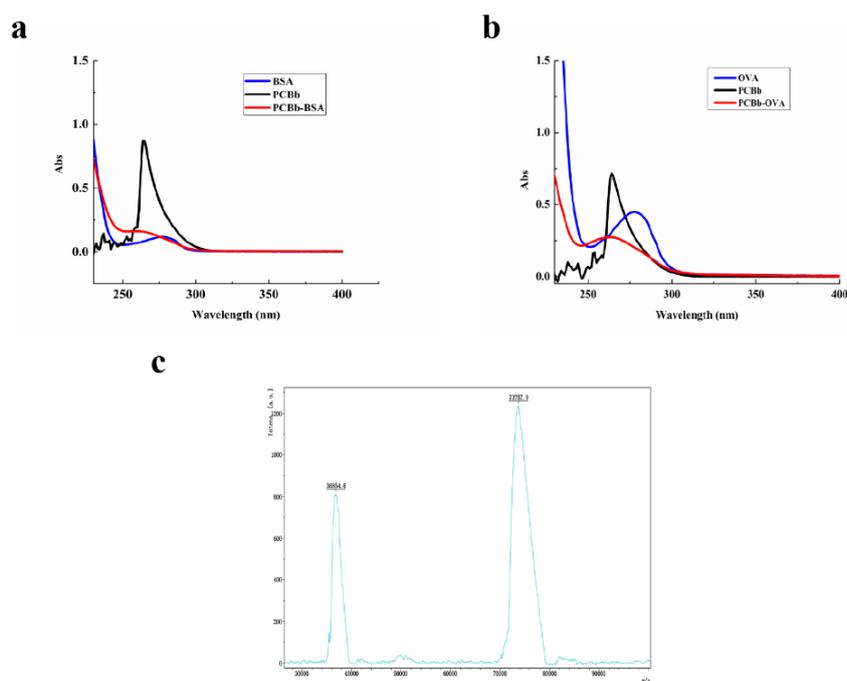


图 2.14 PCBb 免疫原 (a) 和包被原 (b) 紫外光谱图 (c) 飞行时间质谱图

Fig. 2.14 (a) Ultraviolet spectrum of PCBb immunogen (b) coating antigen (c) Time of flight Mass Spectrometer

免疫原 PCBb-BSA 的紫外可见吸收光谱如图 2.14 (a) 所示,半抗原在 269 nm 有紫外吸收峰,BSA 在 278 nm 有紫外吸收峰,而 PCBb-BSA 在 274 nm 处有吸收峰,在 BSA 与半抗原 PCBb 的影响下,紫外吸收峰发生了一定的移动,说明偶联成功且半抗原与 BSA 的偶联比为 16.7:1。同理由图 2.14 (b) 可知,半抗原、载体蛋白 OVA 和 PCBb-OVA 最大吸收峰波长分别为 269 nm、281 nm、274 nm。因此可看到 PCBb-OVA 的紫外吸收峰在 274 nm 处,由于 OVA 与小分子峰的叠加使其明显改变,说明包被原 PCBb-OVA 偶联成功且偶联比为 18.3:1。

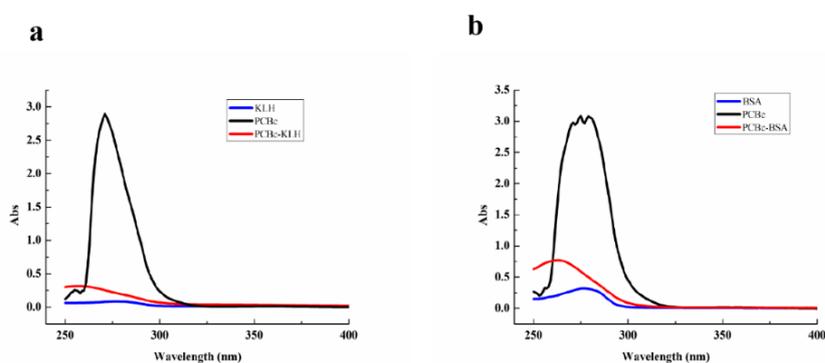


图 2.15 PCBc 免疫原 (a) 和包被原 (b) 紫外光谱图

Fig. 2.15 Ultraviolet spectrum of PCBc immunogen (a) and coating antigen (b)

PCBc-KLH 作为免疫原, PCBc-BSA 作为包被原, 由图 2.15 (a) 可知, PCBc-KLH 最大吸收峰 (265 nm) 介于半抗原的最大吸收峰波长 271 nm 和载体蛋白 KLH 的最大吸收峰波长 278 nm 之间, 吸收峰波长发生蓝移表明偶联成功且偶联比为 15.4:1; 由图 2.15 (b) 可知, 半抗原、载体蛋白 BSA 和 PCBc-BSA 最大吸收峰波长分别为 271 nm、279 nm、264 nm, PCBc-BSA 最大吸收峰波长有偏移表明偶联成功, 偶联比为 7.9:1。

通过蛋白质浓度仪测量免疫原和包被抗原的浓度, 结果如下: PCBa-OVA (6.36 mg/mL)、PCBb-OVA (8.353 mg/mL)、PCBc-BSA (16.67 mg/mL)、PCBb-BSA (14.1 mg/mL) 和 PCBc-KLH (2.15 mg/mL)。

2.3.3 免疫过程尾血评价

采用 PCBb-BSA 和 PCBc-KLH 作为免疫原, 从第三轮免疫开始, 每次免疫一周后进行小鼠尾部采血, 测定血清效价及对 PCBs 的识别效果, 包被原 PCBb-OVA、PCBc-BSA 浓度皆为 1 $\mu\text{g/mL}$, 采用间接 ELISA 测定效价与抑制率。如图 2.16, 结果如下: PCBb-BSA 作为免疫原, 随着免疫次数的增加效价有所增长, 最高可达 1: 8000 左右 (以 $P/N \geq 2.1$ 为判定标准)。但是血清测定显示对于 18 种 PCBs 混标识别的效果较差, 抑制率低于 50%。因此 PCBb-BSA 免疫的小鼠无法进行细胞融合。

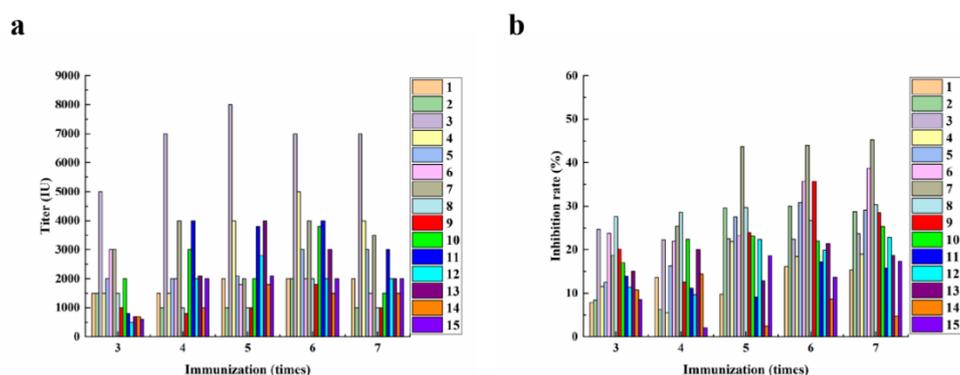


图 2.16 (a) 小鼠免疫过程中的效价评定 (PCBb-BSA); (b) 小鼠在免疫过程中的抑制评价 (n=3)。(数字 1-5: 五只小鼠注射 25 µg 免疫原; 数字 6-10: 五只小鼠注射 50 µg 免疫原; 数字 11-15: 五只小鼠注射 75 µg 免疫原。)

Fig. 2.16 (a) Evaluation of titer in mouse immune process (PCBb-BSA) (b) Evaluation of inhibition of mice in the process of immunization (n=3). (Numbers 1-5: 25 µg dose of immunogen injected in five mice; Numbers 6-10: 50 µg dose of immunogen injected in five mice; Numbers 11-15: 75 µg of immunogen injected in five mice)

以 PCBc-KLH 为免疫原, 在第三次免疫后对小鼠尾血进行评价 (图 2.17), 可以明显看出随着免疫次数增加, 效价在从 1000 增加到 6000, 并且对多氯联苯抑制率能达到 80%左右。对比不同免疫剂量效果, 75 µg/mL 免疫剂量效价与抑制率效果最佳。

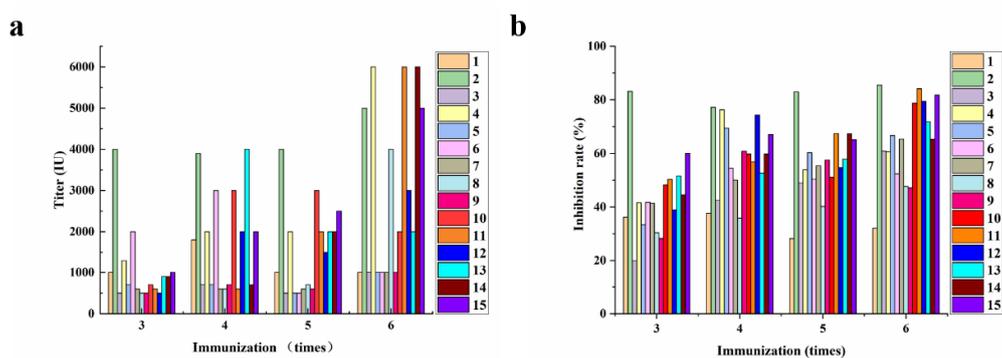


图 2.17 (a) 小鼠免疫过程中的效价评定 (PCBc-KLH); (b) 小鼠在免疫过程中的抑制评价。(数字 1-5: 五只小鼠注射 25 μg 免疫原; 数字 6-10: 五只小鼠注射 50 μg 免疫原; 数字 11-15: 五只小鼠注射 75 μg 免疫原。

Fig. 2.17 (a) Evaluation of titer in mouse immune process (PCBc-KLH); (b) Evaluation of Inhibition in mouse immune process ($n=3$). (Numbers 1-5: 25 μg dose of immunogen injected in five mice; Numbers 6-10: 50 μg dose of immunogen injected in five mice; Numbers 11-15: 75 μg of immunogen injected in five mice)

2.3.4 杂交瘤细胞融合与筛选评价

根据小鼠尾血血清评价结果, 选取效价和对 PCBs 识别效果最好的 11 号小鼠脾脏进行细胞融合。融合前 SP 2/0 状态良好 (图 2.18 a), 圆润饱满, 存活率为 93%, 平均直径为 12.09 μm , 符合融合条件。

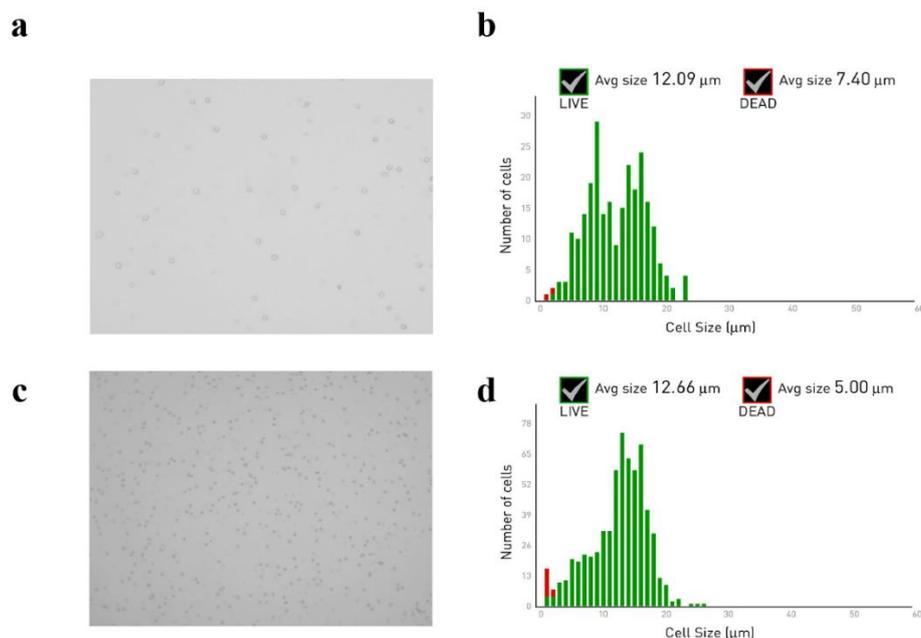


图 2.18 (a) 显微镜下 SP 2/0 细胞形态; (b) SP 2/0 平均粒径大小与存活率; (c) 显微镜下杂交瘤细胞形态; (d) 杂交瘤细胞平均粒径大小与存活率。

Fig. 2.18 (a) Morphology of SP 2/0 cells under microscope; (b) Mean particle size and survival rate of SP 2/0; (c) Morphology of hybridoma cells under microscope; (d) Mean particle size and survival rate of hybridoma cells.

细胞融合后, 6 块 96 孔板中共有 226 个孔长有融合的杂交瘤细胞, 其中有 9 孔为强阳性, 对 PCBs 识别能力进行测定, 识别效果最好 3 个分别为 3-7E (抑制率: 68.306%)、6-11G (抑制率: 75.13%)、6-12G (抑制率: 76.53%), 利用有限稀释法对其进行亚克隆筛选, 最后得到一株能够稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株 (C6-H8), 细胞形态如图 2.18c 所示, 圆润通透, 饱满均匀, 平均粒径为 12.66 μm , 将其扩大培养至 10 瓶以上, 部分冻存, 剩余用来制备腹水。

2.3.5 抗体制备与纯化

将细胞株注射到小鼠体内, 10 d 后待小鼠腹部明显膨胀取腹水, 进行纯化, 获得单克隆抗体平均浓度为 2.594 mg/mL 并进行纯度鉴定。如图 2.19 a 所示, 单克隆抗体在热处理期间被分解, 图中四个平行泳道都没有出现其他蛋白质条带, 只有位于约 25 和 50 kDa 的位置的轻链和重链条带, 表明所得单克隆抗体纯度较高。利用鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒对纯化后的抗体进行亚型鉴定, 结果表明制备得到的单克隆抗体为 IgG1 型 (图 2.19 b)。

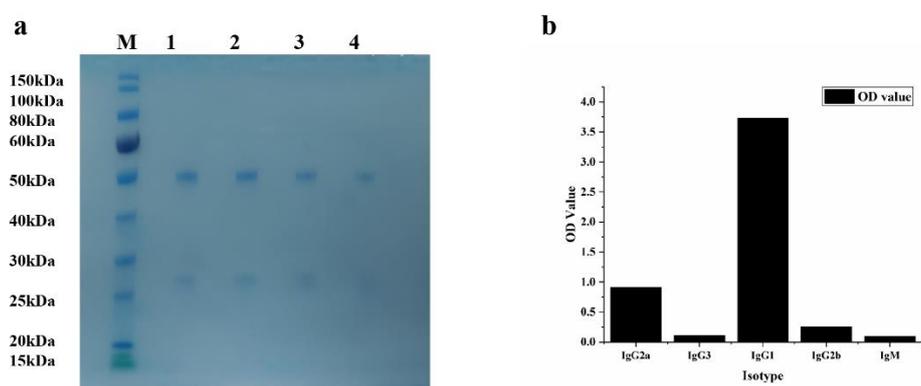


图 2.19 (a) 多氯联苯单克隆抗体的凝胶电泳图 (通道 M: 蛋白 Marker; 通道 1-4: 抗多氯联苯单抗) (b) 抗多氯联苯单抗的亚型。

Fig. 2.19 (a) Gel electrophoresis of anti-PCBs mAb, (lane M: protein Marker; lane 1-4: anti-PCBs mAb) (b) The subtype of anti-PCBs mAb.

2.3.6 单克隆抗体的性能鉴定

2.3.6.1 工作浓度的选择

将包被原与抗 PCBs 单克隆抗体倍比稀释后,通过棋盘滴定获得最佳工作浓度,以 OD_{450} 为 1.0 左右时所对应的 PCBc-BSA 浓度和 PCB 单克隆抗体稀释倍数作为最佳工作浓度。结果如表 2.4 所示,当包被原浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$,多氯联苯单克隆抗体稀释 1000 倍时, OD_{450} 值为 0.9811。

表 2.4 包被原与单克隆抗体最佳工作浓度

Table 2.4 Optimal working concentration of coating agent and monoclonal antibody

包被原 PCBc-BSA ($\mu\text{g/mL}$)	单克隆抗体稀释倍数 Dilution multiple of anti-PCB mAb						
	100	500	1000	2000	4000	8000	16000
0.125	0.6361	0.4007	0.3023	0.2439	0.2286	0.1316	0.0832
0.25	0.8617	0.5126	0.4266	0.3657	0.2559	0.2212	0.1125
0.5	1.1710	0.8762	0.6334	0.4010	0.3858	0.2689	0.2312
1.0	1.6273	1.2542	0.9811	0.5647	0.4230	0.2986	0.2652
2.0	2.4287	1.9024	1.4270	1.0022	0.5937	0.4390	0.3431
4.0	3.2693	2.4475	2.0531	1.2668	0.8942	0.6324	0.4365

2.3.6.2 灵敏度与特异性分析

当工作浓度确定后,对于目标分析物的灵敏度进行测量。对半抗原的标准曲线如图 2.20: $y=0.1509+0.7689/(1+(37.29x)^{1.31879})$, $R^2=0.985$., $IC_{50}=33.12 \text{ ng/mL}$, 线性范围为 7.44-205.43 ng/mL 。

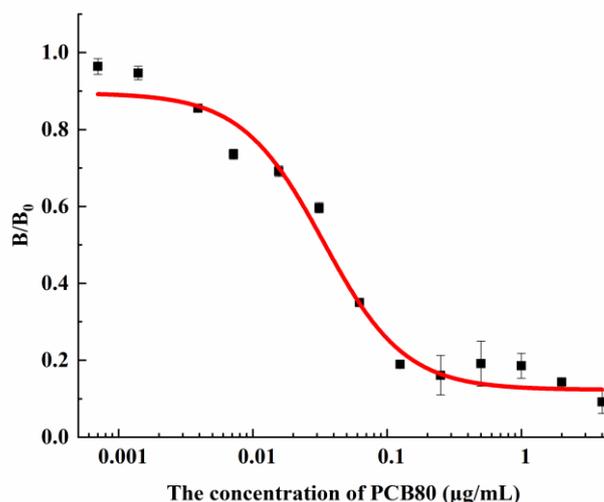


图 2.20 PCB80 标准曲线

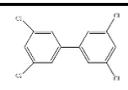
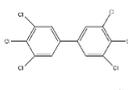
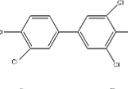
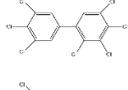
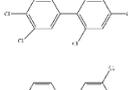
Fig. 2.20 Standard curve of PCB80

与此同时,利用间接竞争 ELISA 方法测定该抗体对 PCBs 同系物的识别能力,检测了 21 种结构类似物,包括 7 种指示类 PCBs (No.28、52、101、118、

138、153、180），12 种类二噁英类 PCBs（No.77、81、105、114、118、123、126、156、157、167、169、189）和两种二噁英 2, 3, 7, 8-四氯二苯并-对-二噁英、2, 3, 7, 8-四氯二苯并呋喃。结果如表 2.5 所示：该抗体能识别 11 种多氯联苯，交叉反应率 2.75%-39.52%。然后，利用 PCBa-OVA 异源包被提高灵敏度，结果表明该抗体无法识别 PCBa-OVA。

表 2.5 多氯联苯单克隆抗体对结构类似物的识别能力

Table 2.5 Recognition ability of anti-PCB mAb to structural analogues

分析物	结构式	mAb-C6-H8	
		IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率(%)
PCB80		33.12	100
PCB169		50.54	65.53
PCB126		62.27	53.18
PCB189		116.88	28.33
PCB157		123.13	26.89
PCB167		201.54	16.43
PCB156		236.83	13.98
PCB111		275.59	12.02
PCB81		329.07	10.06
PCB123		460.30	7.19
PCB77		476.42	6.95
PCB105		>10000	<0.01

2.3.6.3 抗体基因序列与模拟对接

测定抗体基因序列，利用“abYsis”划分其互补决定区（complementarity determining region, CDR），结果如下：该抗体亚型为鼠源IgG1型，如图2.21a，重链部分基因序列。其中蓝色区域为CDR1；红色区域为CDR2；黄色区域为CDR3。而图2.21b为轻链部分基因序列，其中蓝色区域为CDR1；红色区域为CDR2；黄色区域为CDR3。

a

E	I	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	T	P	G	A	S	V	K	I
GAG	ATC	CAG	CTG	CAG	CAG	TCC	GGA	CCT	GAG	CTG	GTG	ACG	CCT	GGG	GCT	TCA	GTG	AAA	ATA
S	C	K	V	S	G	Y	S	F	T	G	Y	K	M	F	W	V	K	Q	S
TCC	TGT	AAG	GTT	TCT	GGT	TAC	TCA	TTC	ACT	GGC	TAC	AAA	ATG	TTC	TGG	GTG	AAG	CAG	AGC
H	G	K	S	L	E	W	I	G	N	I	D	P	Y	N	G	G	T	N	F
CAT	GGA	AAG	AGC	CTT	GAG	TGG	ATT	GGA	AAT	ATT	GAT	CCT	TAC	AAT	GGT	GGT	ACT	AAC	TTC
N	Q	K	F	K	D	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	F
AAC	CAG	AAA	TTC	AAG	GAC	AAG	GCC	ACA	TTG	ACT	GTT	GAC	AAG	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TTC
M	H	L	N	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	W	Y
ATG	CAT	CTC	AAC	AGT	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCA	GTC	TAT	TAT	TGT	GCA	AGA	TGG	TAT
Y	G	T	G	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S				
TAC	GGC	ACG	GGC	TAC	TGG	GGC	CAA	GGC	ACC	ACT	CTC	ACC	GTC	TCC	TCA				

b

D	I	L	M	T	Q	S	P	S	S	M	S	V	S	L	G	D	T	V	S
GAC	ATC	CTG	ATG	ACC	CAA	TCT	CCA	TCC	TCC	ATG	TCT	GTA	TCT	CTG	GGA	GAC	ACA	GTC	AGC
I	T	C	H	A	S	G	I	S	S	N	I	G	W	L	Q	Q	K	P	
ATC	ACT	TGC	CAT	GCA	AGT	CAG	GGC	ATT	AGC	AGT	AAT	ATA	GGG	TGG	ITG	CAG	CAG	AAA	CCA
G	K	S	F	R	G	L	I	Y	H	G	T	N	L	E	D	G	V	P	S
GGG	AAA	TCA	TIT	AGG	GGC	CTG	ATC	TAT	CAT	GGA	ACC	AAC	ITG	GAA	GAT	GGA	GTT	CCA	TCA
R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	S	L	T	I	S	S	L	E	S
AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGA	TCT	GGA	ACA	GAT	TAT	TCT	CTC	ACC	ATC	AGC	AGC	CTG	GAA	TCT
E	D	F	A	D	Y	Y	C	V	Q	Y	G	Q	F	P	Y	T	F	G	G
GAA	GAT	TIT	GCA	GAC	TAT	TAT	TGT	GTA	CAG	TAT	GGT	CAG	TTT	CCG	TAC	ACG	TTC	GGA	GGG
G	T	R	L	E	I	K													
GGG	ACC	AGG	CTG	GAA	ATA	AAA													

图2.21 抗体基因序列 (a) 重链部分; (b) 轻链部分。(蓝色-CDR1; 红色-CDR2; 黄色-CDR3)

Fig. 2.21 Gene sequence of antibody (a) Heavy chain part; (b) Light chain part. (Blue-CDR1; Red-CDR2; Yellow-CDR3)

通过 AutoDock-vina 对蛋白同源模型进行加氢、计算电荷等优化，得到复合物三维结构（图 2.22），最低结合能在-6.20 kcal/mol 左右，结果表明 11 种 PCBs 与抗体结合的主要活性氨基酸位点一致。

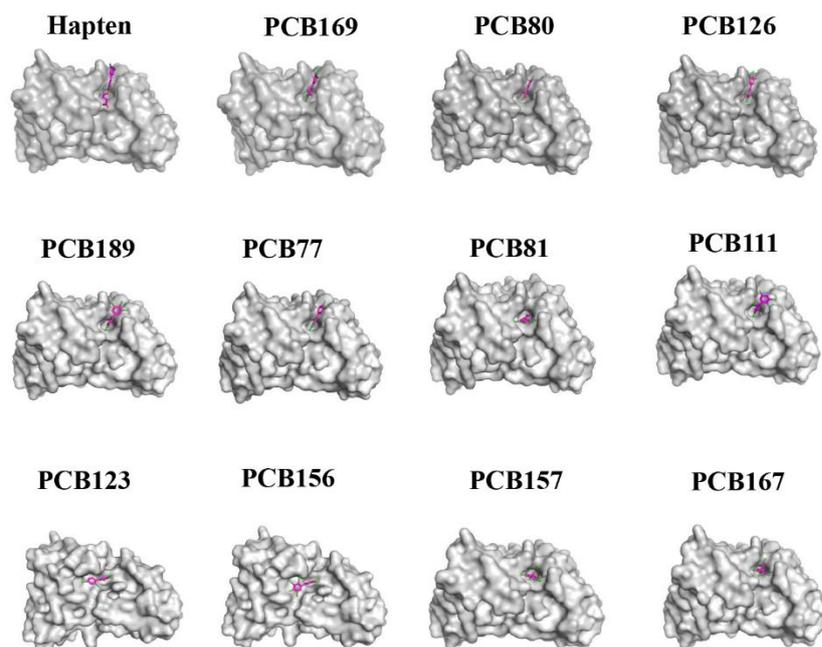


图 2.22 抗体与小分子结合的三维结构图

Fig. 2.22 Three-dimensional structure of antibody binding to small molecules

分析识别谱中 PCBs 与抗体蛋白中活性氨基酸残基的相互作用力(图 2.23), 发现活性蛋白位点酪氨酸 TYR A100、TYR A101、TYR B49 (A: 重链, B: 轻链) 为主要结合氨基酸, 酪氨酸中苯环与 PCBs 中苯环形成 π - π 堆积, 而 TYR A105、GLU B55、ILE A2 和 ARG B45 等氨基酸残基与 PCBs 形成 π -烷基疏水作用, 氢键以及卤键, 这些氨基酸残基对锚定蛋白口袋中的小分子有重要作用。

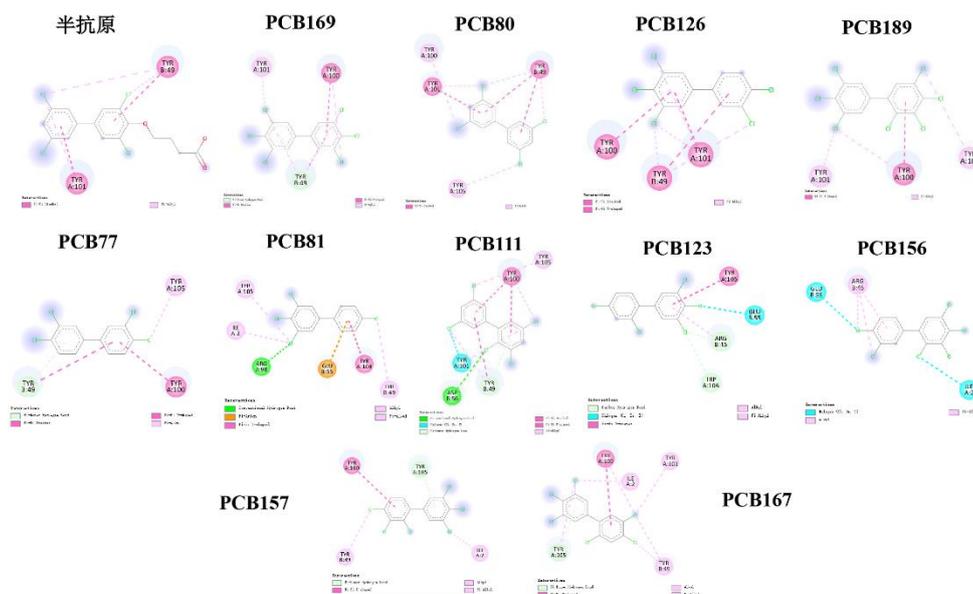


图 2.23 抗体与小分子结合的相互作用力。

Fig. 2.23 Interaction of antibody binding to small molecules.

2.4 讨论

PCBs 属于非极性疏水小分子，活性基团、合适的连接臂以及与母体化合物的结构相似性在产生抗体过程中起着重要作用^[75]。本章根据半抗原设计合成原则，设计并合成了从低氯到高氯的三种半抗原 PCBa、PCBb 和 PCBc，引入具有羧基直链碳臂以暴露分子结构，从而提高免疫原性。PCBa 是通过在 2,4,6-三氯取代基上延伸羧基碳链合成。PCBb 以 2,3,3',4,4',5,5'-七氯联苯为基础，延伸羧基碳链。同样，PCBc 由 3,3',5,5'-四氯联苯和对位羧基碳链组成。HPLC/MS 和 ¹H NMR 的鉴定结果表明半抗原合成成功。

分子量低于 10 KDa 的单个半抗原无法引起免疫应答，需与载体蛋白偶联^[76]。本研究以 PCBb-BSA 和 PCBc-KLH 为免疫原，PCBa-OVA、PCBb-OVA、PCBc-OVA 和 PCBc-BSA 为包被抗原。对免疫原和包被原的不同组合进行了筛选，以获得提高检测灵敏度。用紫外分别在 200 至 400 nm 波长下扫描半抗原、载体蛋白、免疫原和包被原。与半抗原和载体蛋白相比，免疫原和包被抗原的最大吸收波长有一定程度的红移或蓝移，表明偶联成功。根据免疫方案，PCBb-BSA 和 PCBc-KLH 被用作免疫原以诱导免疫应答，其他偶联物被用作 ic-ELISA 的包被原。异源蛋白可避免产生识别蛋白而非小分子靶标的抗体。PCBc-KLH 注射的小

鼠血清效价和抑制率逐渐增加,产生识别 PCBs 的抗体。此外,75 μg 注射剂量可能会引起更好的抗原识别能力。通过有限稀释法亚克隆获得了的单克隆细胞株 C6-H8。比较了 PCBa-OVA、PCBb-OVA、PCBc-OVA 和 PCBc-BSA 作为包被原的异源 ic-ELISA 的检测灵敏度^[77],结果表明只有 PCBc-BSA 或 PCBc-OVA 有效且识别效果相同,此外,该抗体能识别 11 种 PCBs。

通过 AutoDock-vina 同源建模,模拟对接发现 11 种 PCBs 与抗体相互作用的主要氨基酸结合位点一致。其中 TYR 中苯环与 PCBs 中苯环形成 π - π 堆积为分子间主要作用力,其他氨基酸残基 GLU B55、ILE A2 和 ARG B45 与 PCBs 形成氢键与卤键。

2.5 小结

1. 设计合成了从低氯到高氯的 3 种不同结构半抗原并成功合成人工抗原。
2. 成功筛选到一株稳定分泌识别 11 种 PCBs 的单克隆抗体的细胞株, IC_{50} 在 33.12 到 476.42 ng/mL 之间。
3. 通过 AutoDock-vina 软件同源建模,模拟对接分析了该抗体与 PCBs 之间的作用力,主要为 TYR 与 PCBs 中苯环之间的 π - π 键堆叠以及部分氢键与卤键。

第三章. 胶体金免疫层析法检测多氯联苯的建立

3.1 引言

胶体金免疫层析技术 (Gold immunochromatography assay, GICA) 是利用抗原抗体特异性结合与胶体金显色组合的检测技术。以硝酸纤维素膜为固相载体, 在毛细作用下, 样品液沿着硝酸纤维素膜缓慢移动, 当胶体金免疫探针移动至检测线 (T 线) 区域时, 发生特异性结合截留在材料表面, 同时由于胶体金本身颜色效应, 出现红色条带, 从而判断检测结果。胶体金层析试纸技术的简单快捷、经济、高特异性, 使其在体外诊断方面迅速发展, 应用领域涉及临床诊断^[78]、农药兽药残留^[79]、细菌病毒^[80]等生物学检测。

本实验以 PCBs 为检测目标物, 利用已获得的抗 PCBs 单克隆抗体和包被原为基础, 建立胶体金免疫层析方法, 通过制备胶体金探针和优化 pH、抗体量、探针量等条件后, 进行胶体金试纸条组装, 检测鸡肉样品中的 PCBs。

3.2 材料与方法

3.2.1 试剂和材料

鸡肉 (胸脯) 购买于南京盒马; PCBs 标准品 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 购买于南京泰普瑞; 氯金酸 ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 购于美国 Sigma; 碳酸钾、蔗糖、NaCl、柠檬酸三钠等其他试剂 (分析纯) 购自广东西陇化工股份有限公司; 羊抗鼠 IgG、吐温-20、卵清白蛋白 (OVA) 购买于北京索莱宝。实验所用样品垫、金标结合垫、聚氯乙烯 (PVC) 底板、吸水垫购买于上海金标; 超纯水净化仪 (美国, Milli-Q); 硝酸纤维素膜购于美国 Millipore。

3.2.2 仪器设备

德国 WIGGENS WH240-TH 加热磁力搅拌器; Multiskan FC 酶标仪 (Thermo 公司); ZQ2000 微电脑自动斩切机 (上海金标生物科技公司); HT7800 透射电子显微镜 (日本 HITACHI); XYZ3050TM 胶体金喷膜机 (Bio-Dot 公司)。

3.2.3 缓冲液配制与预处理

1. 样品垫浸泡液：蔗糖 2.5 g、BSA 2.0 g、NaN₃ 0.02 g、100 mL 0.01 M PBS 溶解，过滤，4°C 保存待用。
2. 金标垫封闭液：蔗糖 10 g、Na₃PO₄·12H₂O 0.7602 g、BSA 5 g、Tween-20 250 μL 混合溶解于 100 mL 超纯水，过滤，4°C 保存待用。
3. 0.1 M K₂CO₃ 溶液：0.138 g 碳酸钾溶于 10 mL 超纯水，过滤备用。
4. 1% 氯金酸浓缩液：氯金酸：0.5 g；超纯水：50 mL，过滤，棕色试剂瓶 4°C 储存。
5. 1% 柠檬酸三钠：二水合柠檬酸三钠 (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O) 0.5 g；超纯水：50 mL，0.45 μm 滤膜过滤储存（现配现用）。
6. 1% BSA 溶液：用 100 mL 超纯水溶解 1.0 g BSA，4°C 保存。
7. mM 硼酸盐缓冲液：硼酸 0.1 g，PEG₂₀₀₀₀ 2.0 g，NaN₃ 0.2 g，混合溶解于 100 mL 超纯水，过滤备用。
8. 玻璃器皿需预处理：将 250 mL 锥形瓶、磁力搅拌子、烧杯等放入王水中浸泡一天以上，蒸馏水冲洗，烘干。
9. 金标垫和样品垫处理：为防止特异性吸附，将金标垫与样品垫分别在金标垫封闭液、样品垫封闭液中浸泡 4 h，60°C 干燥箱过夜，密封保存备用。

3.2.4 胶体金的制备

胶体金试纸条的适用粒径一般在 20-40 nm 之间，在此粒径之间的溶液为红色。本章利用柠檬酸三钠还原氯金酸制备胶体金^[81]。

将 1% HAuCl₄ 溶液稀释为 0.01% HAuCl₄ 溶液，取 200 mL 稀释液于烧杯中，于磁力搅拌器煮沸 5 min，迅速加入 4.6 mL 1% 柠檬酸三钠溶液，边加边搅拌，继续加热沸腾 5 min，室温避光冷却定容到 200 mL，4°C 备用。通过透射电子显微镜（TEM）和紫外分光光度计进行表征。

3.2.5 胶体金标记探针的制备

3.2.5.1 胶体金标记抗体最佳 pH 选择

利用 K₂CO₃ 调节设置溶液不同梯度的 pH。取一定数量 2 mL 离心管编号并添加胶体金溶液（1 mL），加入不同体积的 0.1 M K₂CO₃ 溶液调节 pH 至 5.0、5.5、

6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5，振荡均匀，加入抗体（1.0 mg/mL）5 μ L，充分震荡，室温等待 2 h，观察溶液颜色，选择未出现沉淀的管。进行 400-600 nm 紫外扫描，选取吸光值最大时对应的 pH，为最佳条件。

3.2.5.2 最佳抗体量的选择

取 10 个 1.5 mL 离心管并编号 1-10，加入优化好的 0.1 M K_2CO_3 的体积用量并混匀，每管加入对应编号的抗体（1.0 mg/mL）体积（ μ L），振荡混匀，室温反应 15 min，再分别加入 100 μ L 10% NaCl 溶液，静置 15 min，观察颜色变化，选择没有变色的最低抗体浓度。

3.2.5.3 金标探针的制备

为保证探针的稳定性，抗体加入最小标记量的 1.2 倍为理论最佳，在以上两个优化条件下，室温下反应 30 min；加入 1% BSA 溶液进行封闭，室温磁力搅拌 15 min，离心（1500 rpm，15 min），吸取上清，再离心（12000 rpm，35 min）弃上清，沉淀用 0.1 mL 2 mM 硼酸盐缓冲液复溶，即为多氯联苯胶体金探针，4 $^{\circ}$ C 避光保存。

3.2.6 胶体金试纸条组装与结果判定

3.2.6.1 试纸条组装

胶体金免疫层析试纸条主要由 PVC 底板、样品垫、检测线、金标垫、质控线、硝酸纤维素膜（NC 膜）和吸水垫（图 3.1）组成。分别将 PCBc-BSA 和羊抗鼠 IgG 抗体喷涂于 NC 膜上 T 线和 C 线，于 37 $^{\circ}$ C 下烘干。具体组装步骤如下：首先将 NC 膜贴在 PVC 底板中间，样品垫、金标垫、吸水垫依次贴于 NC 膜上且均重叠 2 mm 左右，最后采用试纸条自动切割仪切成 4.0 mm 宽的试纸条，干燥装入密封袋储存备用。

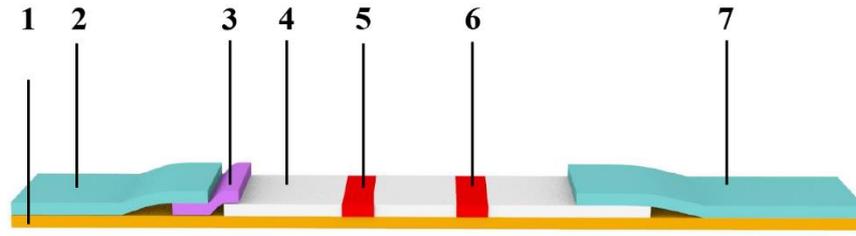


图 3.1 免疫层析试纸条结构图 (1. PVC 底板, 2. 样品垫, 3. 金标垫, 4. NC 膜, 5. 检测线 (T 线), 6. 质控线, 7. 吸水垫)

Fig. 3.1 Structure of colloidal gold immunochromatographic test strip (1. Polyvinyl chloride (PVC) bottom plate, 2. Sample pad, 3. Gold standard pad, 4. NC membrane, 5. Detection line (t line), 6. Quality control line, 7. Absorbent pad)

3.2.6.2 结果判定

在实际操作过程中, 只需要将 100 μL 待测样品、5% DMSO-PBS 稀释的多氯联苯标准品溶液或者空白溶液滴加在样品垫上, 15 min 后进行结果判定 (图 3.2)

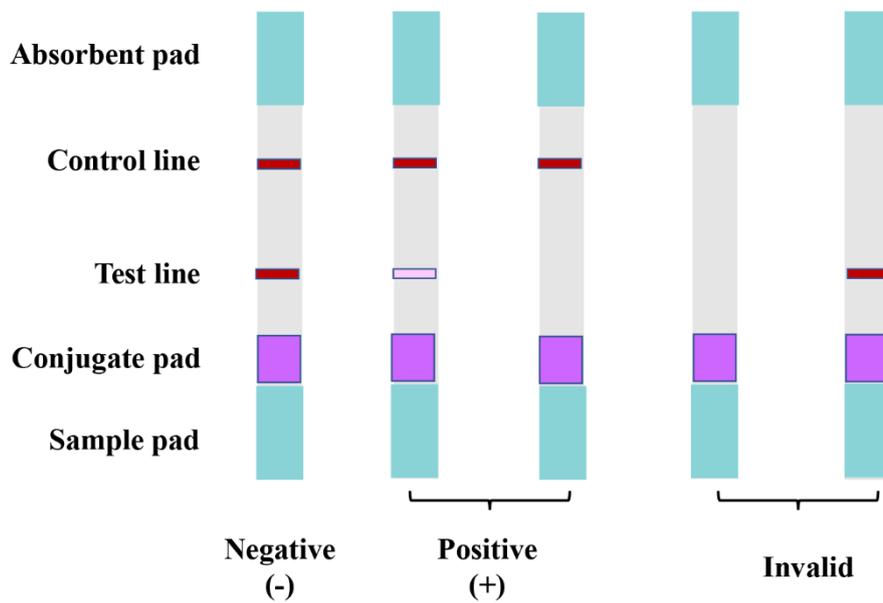


图 3.2 免疫层析试纸条检测结果判定图

Fig. 3.2 Determination chart of colloidal gold immunochromatographic test strip test results

当样品液不含有或含有低于检测限浓度的多氯联苯时，部分探针与 T 线上的包被原结合，多余的探针与 C 线的羊抗鼠二抗结合，使得 C、T 线均出现红色条带，判定结果为阴性。

当样品液中存在大于检测限浓度的多氯联苯时，由于部分金标抗体与多氯联苯结合而与包被原结合的量变少，导致 T 线颜色消失或变浅，C 线仍出现红色条带，结果判定为阳性。

当加入样品液后，观察到 C 线未显现红色条带时，无论 T 线是否显色，结果判定为试纸条无效。

3.2.7 质控线、检测线浓度及金标探针量的优化

3.2.7.1 检测线、控制线喷涂浓度的优化

通常，T 线上的包被原浓度过高，会降低检测的灵敏度，过低，T 线颜色过浅，不利于判断，因此需要对试纸条的 T 线上的包被原浓度进行优化。用 PBS 缓冲液（0.01 M，pH 7.4）对完全抗原 PCBc-BSA 进行稀释（1、2、3、4、5、6、7 mg/mL），分别喷于 NC 膜上形成 T 线，同时在 C 线喷上适宜浓度（0.6、0.8、1 mg/mL）的羊抗鼠二抗，37°C 烘箱干燥 12 h。结束后，将不同包被原浓度的试纸条分别插入到金标抗体溶液中，等待 5-10 min，比较各浓度下试纸条的 T 线颜色，选择颜色明显且条带均匀的最低包被浓度。T 线浓度确定后，同样对羊抗鼠二抗浓度进行稀释，当 C、T 线颜色相同即可。

3.2.7.2 探针量的优化

当探针量过多，会导致竞争不明显，影响灵敏度，而探针量过少，会导致 T、C 颜色较浅，干扰正常结果判断。因此对探针量进行梯度试验，分别加入 0.5、1、1.5、2 μL 探针量进行优化。

3.2.8 试纸条最低检出限与交叉反应测定

在最优条件下测定胶体金试纸条对 PCBs 最低检测线，配制 4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 PCB80 样品液，分别取 100 μL 于 96 孔酶标板中，插入试纸条进行检测，15 min 后，观察当 T 线完全消失时判定为试纸条最低检出限。根据识别效果最好的半抗原最低检测线调整其他多氯联苯同系物的检测样品液浓度进行检测。

3.2.9 试纸条稳定性评价

参考阿伦尼乌斯公式： $d(\text{Ink})/dT = E_a/RT^2$, E_a 为表观活化能， R 为摩尔气体常量。将胶体金试纸条放置 37°C 培养箱，37°C 一个月相当于常温 1 年。分别在第 7 天，第 14 天，第 28 天，第 56 天利用一定浓度的 PCB80 进行检测实验，判断检测性能是否改变。

3.2.10 基质效应与添加回收

利用搅拌机将空白鸡肉样品均质化，称取 5 份 2 g 样本，于 50 mL 离心管中，向其中分别加入 2 mL 超纯水与 0.5 mL 1 M HCl 酸解鸡肉组织，37°C 水浴超声 1 h；然后用 0.1 M 磷酸氢钾和 1 M 氢氧化钠将 pH 值调节至 7.0。加入 5 mL 正己烷充分振荡 10 min 并离心（8000 rpm，10 min）吸取有机相，氮吹，其中部分用 5% DMSO-PBS 缓冲液分别稀释 5、10、20、40 倍后进行试纸条检测，5% DMSO-PBS 作为基质效应对照。而另一部分利用 GC-MS/MS 仪器验证，在正己烷提取后需加入 C18 进行纯化，过膜，然后进行仪器检测。

添加一系列浓度的标准品到鸡肉样本中，均质、酸化、提取、稀释去除基质干扰。滴加到制备好的试纸条上进行检测（100 μL /孔），整个检测过程在 20 min 以内。

3.3 结果

3.3.1 胶体金的制备与鉴定

以柠檬酸三钠为还原剂，得到直径为 20 nm 左右的金纳米颗粒。如图 3.3(b) 胶体金溶液为酒红色，澄清透亮。从 TEM 电镜图可以看到，金纳米粒子直径约 20 nm，满足所需的胶体金的直径要求，且大小均一，分散性良好。从 (b) 图看来，该金纳米粒子在 520 nm 处有特征吸收峰，符合 20 nm 粒径的吸收峰，表明胶体金合成成功。

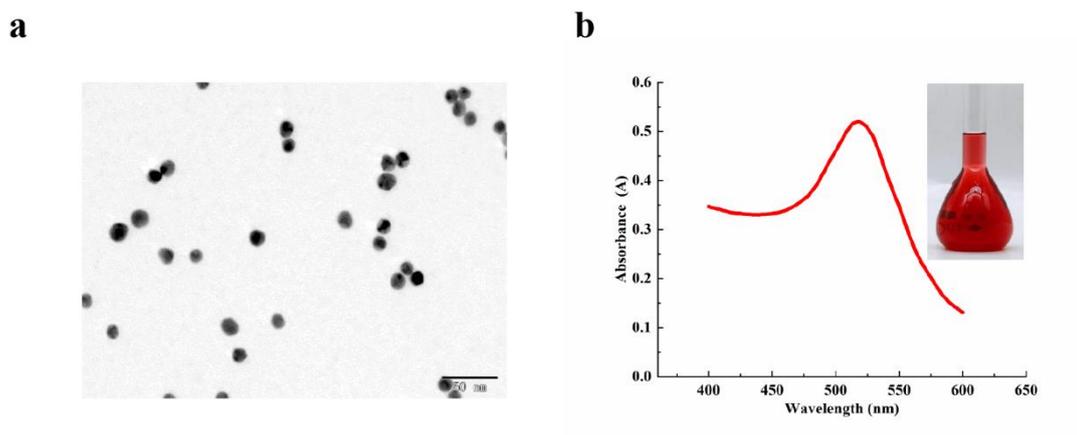


图 3.3 (a)胶体金溶液 TEM 图; (b) 胶体金溶液紫外扫描图

Fig. 3.3 (a) TEM of colloidal gold solution; (b) UV scanning of colloidal gold solution

3.3.2 金标抗体制备

3.3.2.1 最佳 pH 条件确定

胶体金与抗 PCBs 单克隆抗体偶联时采用 0.1 M 的 K_2CO_3 进行调节。在 1 mL 胶体金中分别加入不同量的 K_2CO_3 溶液调节 pH 至 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0，混匀后分别加入 5 μ L 的 PCB 单克隆抗体进行偶联获得不同 pH 的金标抗体，反应结束后，取 100 μ L 进行吸光度测定，结果如图 3.4 所示，选择加入 K_2CO_3 后吸光值最高，此时溶液无沉淀，此时溶液 pH 8.0 为最佳。

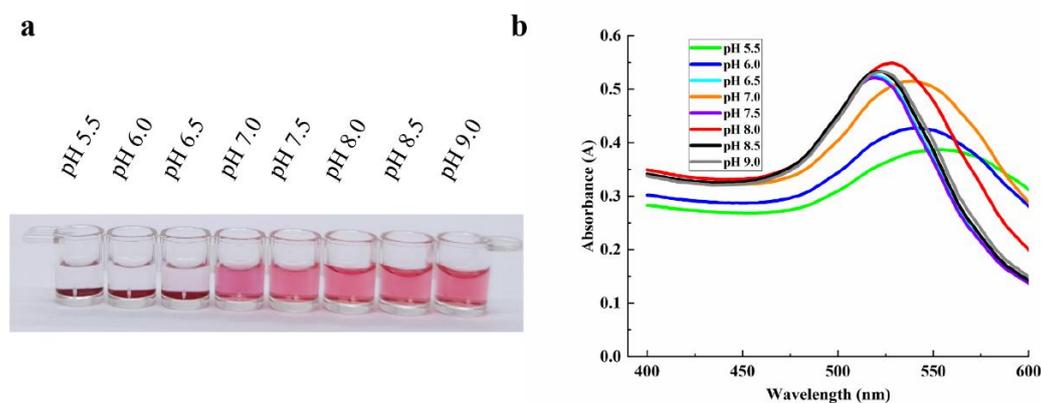


图 3.4 胶体金探针最佳 pH 选择 (a) 实验图; (b) 不同 pH 紫外吸收谱图

Fig. 3.4 Optimal pH selection of colloidal gold probe (a) experimental diagram; (b) UV absorption spectrum at different pH

3.3.2.2 最佳抗体用量确定

金纳米颗粒表面带有负电荷，相互排斥使其为稳定的胶体状，在加入 10% 的 NaCl 电解质时，由于盐离子破坏电荷平衡，发生聚沉，由酒红色变为灰色。随着抗体浓度的增加，胶体金溶液逐渐稳定，颜色由黑灰色逐渐变为透亮的橙红色。多氯联苯单克隆抗体（1.0 mg/mL）量达到 5 μg 及以上时，胶体金较为稳定且无明显变化。为进一步稳定胶体金探针，需要在最低抗体用量的基础上进行调整，理论最佳为最小量的 1.2 倍即 6 μg ，反应结束后，取 100 μL 于多功能酶标仪中进行吸光度测定。通过试纸条进行检验，多氯联苯胶体金探针的最佳抗体用量为 6 μg 。

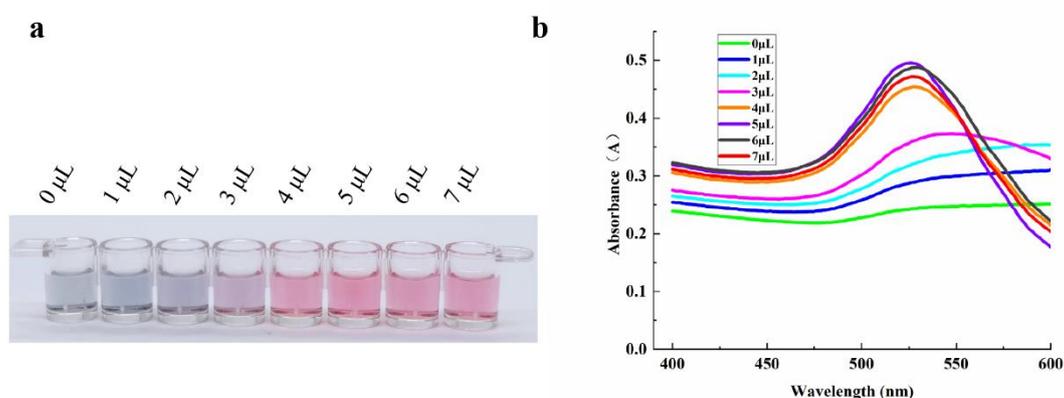


图 3.5 胶体金探针最佳抗体标记浓度 (a) 实验图; (b) 不同抗体浓度紫外吸收光谱图

Fig. 3.5 Optimal antibody labeling concentration of colloidal gold probe; (a) Experimental diagram; (b) UV absorption spectra of different antibody concentrations

3.3.2.3 检测线、质控线浓度及探针量优化

T 线上的包被原浓度进行优化，选择使 T 线颜色适中，线形不扩散的包被抗原浓度为最佳检测抗原浓度，然后调整 C 线喷涂浓度使他们颜色统一。如图 3.6a 所示，当选择 PCBc-BSA 浓度为 1、2、3、4、5 mg/mL 时，T 线颜色较浅。当检测线喷涂浓度为 6 mg/mL，C 线喷涂浓度为 0.6 mg/mL 时，T 线、C 线均显色清晰，即为最佳浓度。为了提高检测性能，探针的使用量（图 3.6b）是影响灵敏度与肉眼判断的关键因素，1.5 μL 探针量为最佳。

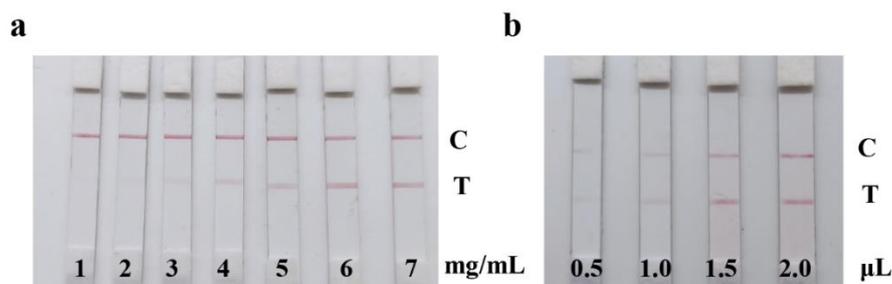


图 3.6 (a) 胶体金试纸条 T 线喷涂浓度优化; (b) 探针量优化

Fig. 3.6 (a) Optimization of spraying concentration of colloidal gold test strip T-line;(b) Optimization of probe

3.3.3 试纸条最低检出限与交叉反应

用 5% DMSO-PBS 配置浓度为 4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCB80 标准品进行测定, 阴性对照不添加 PCB80, 当肉眼观察 T 线颜色消失时为胶体金最低检出限, 如图 3.7 (a) 所示, 裸眼检测限浓度值为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将浓度均为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PCB169、PCB126、PCB189、PCB157、PCB167、PCB156、PCB111、PCB81、PCB123、PCB77 标准品滴加到胶体金试纸条进行交叉反应检测, 如图 3.7 (b) 所示, 滴加 PCB169、PCB126、PCB189 的试纸条 T 线颜色消失或者变浅, 呈阳性结果; 对 PCB157、PCB167、PCB156、PCB111、PCB81、PCB123、PCB77 呈阴性结果。该结果表明胶体金免疫层析试纸条对部分药物识别能力较差。

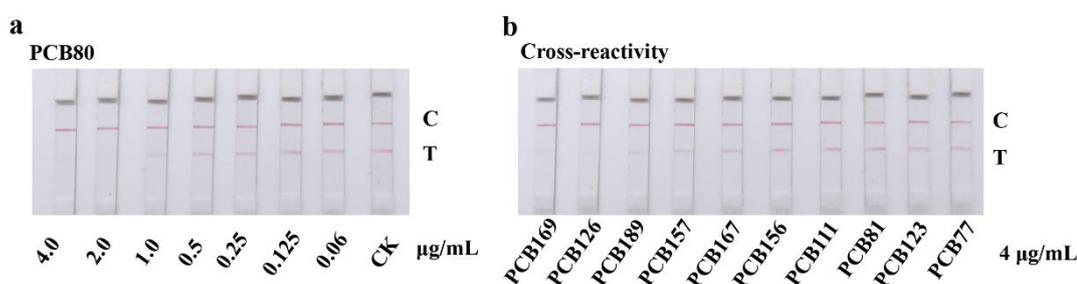


图 3.7 (a) 试纸条对 PCB80 的检出限; (b) 特异性检测

Fig. 3.7 (a) Detection limit of test strip to PCB80; (b) Detection of specificity

对于 PCB169、PCB126、PCB189 最低检出限, 根据在 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准品条件下的特异性检测结果, 对添加标准品浓度进行调整。结果如图 3.8 所示: 对于裸眼检出限 PCB169 为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、PCB126: 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、PCB189: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

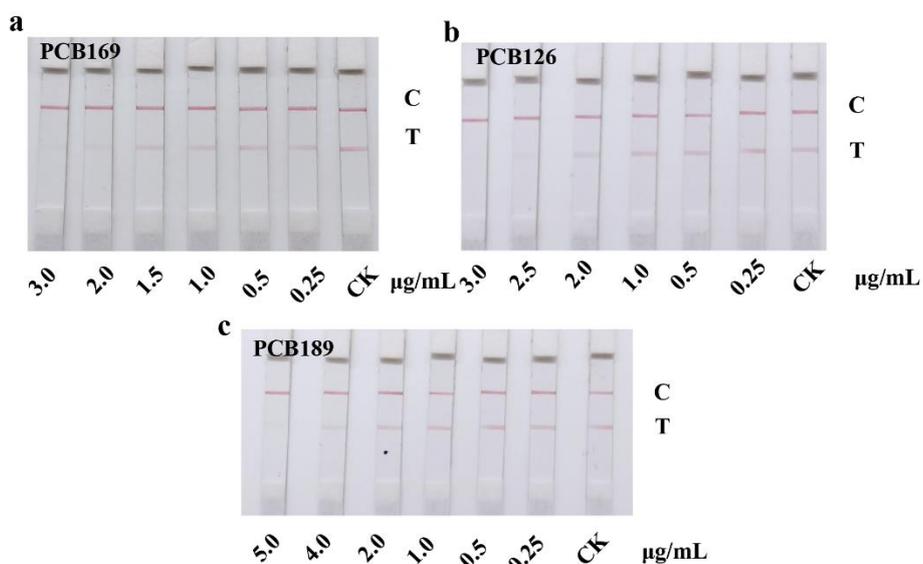


图 3.8 (a) 试纸条对 PCB169 的检出限; (b) 试纸条对 PCB126 的检出限; (c) 试纸条对 PCB189 的检出限

Fig. 3.8 (a) Detection limit of test strip to PCB169; (b) Detection limit of test strip to PCB126; (c) Detection limit of test strip to PCB189.

3.3.4 试纸条的稳定性

根据检测灵敏度, 利用 $2 \mu\text{g/mL}$ 的 PCB80 进行验证, 结果如图 3.9 所示, 在第 7, 14, 28 天时, 试纸条性能相对稳定, 而在 56 天时, 在 $2 \mu\text{g/mL}$ 的 PCB80 添加条件下, T 线出现些许颜色, 说明该试纸条能够在常温下保存一年。

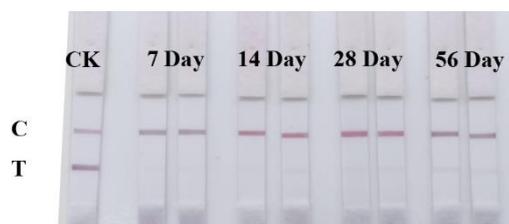


图 3.9 试纸条的稳定性实验

Fig. 3.9 The stability test of test strip

3.3.5 基质干扰与添加回收

为了排除基质干扰,对提取后的溶液进行一定倍数稀释(5% DMSO-PBS 作为稀释液),结果如表 3.1 所示,稀释倍数为 20 时,结果一致。小于 20 倍时出现假阴性,表明稀释 20 倍以上可消除基质干扰。

表 3.1 基质对胶体金试纸条的影响

Table 3.1 Effect of matrix on colloidal gold test strip

样品	多氯联苯 浓度 ($\mu\text{g/g}$)	5% DMSO- PBS	基质稀释倍数			
			5	10	20	40
鸡肉	0.5	-	-	-	-	-
	1.0	±	-	-	±	±
	2.0	+	-	±	+	+

注:“-”代表阴性,“+”代表阳性,“±”代表弱阳性

在此基础上,胶体金试纸条分别检测了鸡肉样品中的 PCB80,样品处理后的 PCB80 的终浓度依次为 0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g/g}$,随着标准品浓度的增加,T 线颜色逐渐变浅,当 PCB80 浓度为 1 $\mu\text{g/g}$ 时,T 线颜色开始明显变浅,当 PCB80 浓度为 2.0 $\mu\text{g/g}$ 时,T 线颜色完全消失,说明鸡肉样品试纸条的可视化检测区间为 0.5~2.0 $\mu\text{g/g}$ 。

表 3.2 胶体金免疫层析法检测与 GC-MS/MS 法对鸡肉样品中 PCB80 添加回收结果

Table 3.2 Recovery results of pcb80 addition in chicken samples by colloidal gold immunochromatography and GC-MS / MS

添加浓度 Spiked concentration ($\mu\text{g/g}$)	胶体金免疫 层析试纸条 GIGA (n=3)	GC-MS/MS	
		回收率 Recovery (%)	变异系数 CVs (%)
20	±/±/±	87.9	9.8
30	±/±/±	95.3	11.5
40	+ / + / +	94.2	8.6

注:“-”代表阴性,“+”代表阳性,“±”代表弱阳性

3.4 讨论

通常胶体金探针的制备,金纳米颗粒本身粒径大小与所用标记的抗体本身的性质为关键的两个因素。粒径过大会降低在溶液中的稳定性,同时在膜层析速度较慢或堵膜,增加检测时间且钝化了灵敏度。然而,如果胶体金颗粒过小,则在溶液中均一性较差,导致试纸条性能不稳定^[82]。胶体金试纸条性能本身对于抗原的检测取决于抗体。活性、纯度、亲和力等都有影响。一般来说,探针标记用抗体纯度越高,性质越均一,制备的胶体金试纸条性能越稳定,检测结果越稳定可靠。本实验中制备的胶体粒径为 20 nm,符合要求。

胶体金探针制备过程中主要考虑的因素为 pH 与抗体量。外层带有负电荷的金纳米颗粒相互排斥使溶液为稳定的胶体状。由于抗体表面带有正电荷,胶体金吸附抗体的能力取决于溶液的 pH 值^[83]。当溶液 pH 值为弱碱性时,由于溶液中呈负电荷,抗体吸附于金颗粒表面量受限;当溶液 pH 值为酸性时,溶液呈正电荷,大量抗体覆盖纳米金表面,探针易聚沉,同时由于抗体过量,导致检测灵敏度下降也浪费抗体。最佳的抗体用量通常被认为是最低抗体量的 1.2 倍。实际操作时,溶液 pH 值应该微高于抗体等电点,溶液带有少量负电荷,更利于探针的稳定性。本研究制备了胶体金探针的免疫层析试纸条,由于抗体本身亲和力较小,T 线包被原喷涂量为 6 mg/mL,导致试纸条灵敏度降低,最佳可视检测限约 2 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.5 小结

本章采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液,电镜结果显示,颗粒呈球形,大小一致分散均匀,粒径约为 20 nm。优化 pH、抗体量、探针量等条件,制备胶体金免疫层析试纸条,由于抗体亲和力较差,最低可视化检出限约为 2 $\mu\text{g/mL}$ 。

第四章 基于聚集诱导发光荧光微球固相免疫方法检测鸡肉中的多氯联苯

4.1 引言

近年来,有机发光材料已经广泛应用于生物检测、传感和光电器件等各个领域。然而,在大多数发光材料分子间会产生较强的 π - π 堆积,因此它们往往面临聚集导致发光猝灭(Aggregation caused quenching, ACQ)效应。聚集诱导发光(AIEgens)分子在溶解状态下不发射,但在聚集状态下表现出强发射,这与传统荧光团中观察到的ACQ现象相反^[84]。AIE分子在稀溶液状态下不发光或发光微弱,而在聚集态或固态下具有较高的荧光信号,使得AIE分子被广泛应用到荧光成像^[85]、临床^[86]、食源性病菌^[87]检测等领域,在荧光检测领域表现突出,但目前还未应用到PCBs的检测中。本实验利用AIE材料开发固相免疫方法检测PCBs,11种PCBs检测限(LOD)为0.32至42.15 ng/mL。加标鸡肉样品的回收率为76.90%–91.64%,变异系数为8.5%–14.4%,可作为食品中PCBs的快速监测工具。

4.2 材料与方法

4.2.1 主要试剂和材料

鸡肉购买于南京盒马;羊抗鼠二抗(goat anti-mouse immunoglobulin G)购买于北京索莱宝;2-(*N*-吗啉基)乙磺酸水合物缓冲溶液(MES)和*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)购买于美国Sigma;正己烷、 β -巯基乙醇(南京赛吉科技有限公司)、二氯甲烷、C18和PSA皆为分析纯购买于天津市科密欧化学试剂有限公司;AIEgens荧光微球由中国香港大学赠送。其他试剂耗材同2.2.1

4.2.2 主要仪器设备

微孔板恒温振荡器和GC-MS/MS(美国,Thermo);Spark 10M多功能酶标仪(Tecan,新西兰);其他相关仪器同2.2.2。

4.2.3 荧光探针的制备及条件优化

4.2.3.1 羊抗鼠 IgG 标记的 AIEgens 荧光微球

本实验利用活泼酯法^[88], 将 AIE 荧光微球表面的羧基与羊抗鼠 IgG 上的氨基偶联, 具体操作步骤如下。首先取 2 份 20 μL 羧基 AIE 荧光微球重悬于 180 μL MES 缓冲溶液 (pH 6.0) 中, 冰浴超声处理 5 min; 添加 100 μL 10 mg/mL EDC 和 NHS 混合物以活化微球表面的羧基, 室温下微孔板恒温振荡器中摇动振动 (450 rpm, 15 min); 向混合物中滴加 1 μL 20 mM β -巯基乙醇充分振荡终止活化, 离心 (8000 g, 9 min) 弃上清, 用 MES 缓冲液洗涤 2 遍; 离心 (16000 g, 6 min) 并用 300 μL PBS (pH 7.4) 重悬。此外, 添加 200 μL 羊抗鼠 IgG (1 mg/mL), 室温下振荡反应 2 h, 然后离心 (13000 g, 15 min), 并用 200 μL PBS (0.01 M, 1% BSA) 封闭 0.5 h。最后, 用保存液 (0.01 M PBS, pH 7.4, 含有 2% 果糖、1% 聚乙二醇 20000、5% 蔗糖、1% 牛血清白蛋白和 0.4% 吐温 20) 重悬, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。探针偶联结果的表征, 将 100 μL 抗体溶液 (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 涂覆在 96 孔板上, 并用 200 μL 3% 脱脂乳封闭。最后, 添加 100 μL AIE IgG (0.0054 mg/mL) 结合物, 并使用裸 AIE 微球和羊抗鼠 IgG 作为对照。通过检测荧光值判断是否偶联成功 (在 365 nm 激发, 在 650 nm 发射)。

4.2.3.2 抗多氯联苯 mAb 标记的 AIEgens 荧光微球

同时, 按照以上步骤偶联 AIE 荧光微球与抗多氯联苯 mAb (1 mg/mL), 参考第三章探究 AIE 荧光微球试纸条检测性能。

4.2.3.3 羊抗鼠 IgG 饱和标记量的确定

选择 2 μL 的 AIEgens 荧光微球 (10 mg/mL) 分别与 5、10、15、20、25 μL 的羊抗鼠 IgG (1 mg/mL) 偶联, 得到不同标记量的荧光探针, 最后利用固相免疫方法 (4.2.4.1) 分析进行读取荧光值, 确定饱和量。

4.2.4 AIEgens 荧光微球固相免疫方法的建立与优化

4.2.4.1 固相免疫方法的建立

基于酶标板的固相免疫方法参考间接竞争 ELISA, 首先将稀释的人工抗原加入 96 孔酶标板 (100 $\mu\text{L}/\text{孔}$), 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下包被 12 h; 然后, 添加 200 μL 的 3% 脱

脂牛奶 37°C 封闭 2 h, 用洗涤缓冲液 (PBST) 清洗酶标板三次; 添加 50 μ L PCB 标准溶液和 50 μ L 抗体稀释溶液, 并在 37°C 下培养 1 h。最后, 添加 1 μ L 荧光探针 (0.54 mg/mL) 37°C 条件下温育 40 min, 洗涤干净, 每孔加入 100 μ L PBS 通过多功能酶标仪记录荧光强度 (365 nm 激发, 650 nm 发射)。如图 4.1 所示, 当溶液中不存在多氯联苯时, 检测到荧光值很高; 当溶液中存在多氯联苯时, 由于包被原与之竞争抗体, 荧光值降低。

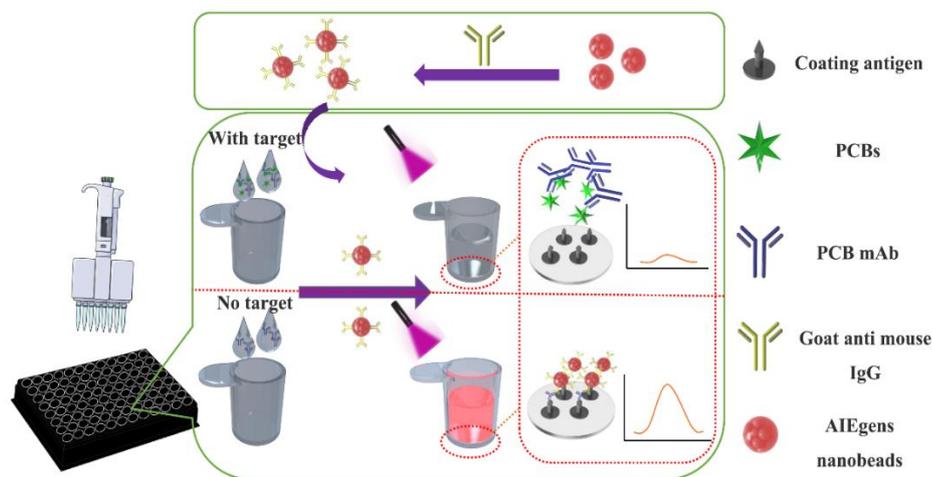


图 4.1 基于 AIEgens 微球免疫方法的建立

Fig. 4.1 Establishment of immune method based on AIEgens microspheres

4.2.4.2 包被原、单克隆抗体浓度优化

将包被原与多氯联苯单克隆抗体倍比稀释后, 通过棋盘滴定获得最佳工作浓度, 与 TMB 显色不同的时, 荧光值无法固定数值为多少来判断, 设置不同的包被原浓度进行实验, 采用 F_{\max}/IC_{50} 作为判断指标^[89]。 F_{\max}/IC_{50} 高的所对应的 PCBc-BSA 浓度和 PCB 单克隆抗体稀释倍数作为最佳工作浓度。(F_{\max} 为不加目标物时的最大荧光值)

4.2.4.3 反应体系 pH 的选择

母液的配置:

0.2 M Na_2HPO_4 : 称取 71.6 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 溶于 1 L 超纯水。

0.2 M NaH_2PO_4 : 称取 31.2 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 溶于 1 L 超纯水。

先配 0.2M PB (pH=7.4, 100 ml): 取 19 ml 0.2 M 的 NaH_2PO_4 , 81 mL 0.2mol/L Na_2HPO_4 混合均匀。

表 4.1 PBS 缓冲液配置表

Table 4.1 Configuration of PBS buffer

pH	0.2 M NaH ₂ PO ₄ (mL)	0.2 M Na ₂ HPO ₄
6.0	87.7	12.3
7.4	19	81
8.0	5.3	94.7

磷酸盐缓冲液 (pH=5、9): 取一定量 0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液, 用氢氧化钠调节。

4.2.4.4 有机溶剂含量的选择

由于小分子化合物的疏水性, 需要将其溶解且考虑抗体活性, 所以需优化有机溶剂的含量。将 DMSO 加入 PBS 缓冲液, 分别调成浓度为 0、2、5、10、20% 的 DMSO-PBS 缓冲液, 按照 4.2.4.1 建立免疫方法进行评价, 确定最佳条件。

4.2.4.5 免疫探针量的选择

加入探针量的多少会影响读出的荧光值, 过少导致反应不完全, 荧光值过低; 过多浪费。为了提高免疫分析的性能以及实验成本, 选择加入不同免疫探针的量 (0、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 μ L) 进行条件优化。

4.2.5 基于 AIEgens 荧光微球免疫方法检测 PCBs

使用 DMSO 溶解配置 PCBs 标准品至浓度为 100 μ g/mL, 然后用 PBS (pH 7.4) 对 PCBs 标准溶液进行梯度稀释配置不同浓度。加入样品反应后的荧光信号使用以下等式进行归一化处理: $\text{归一化信号} = \frac{F_x - F}{F_0 - F} \times 100\%$

其中, F_0 是无目标物的溶液中荧光信号, F_x 是不同浓度分析物的荧光信号, F 是背景值。免疫分析的对数 C 和灵敏度用 IC_{10} 值表示。这些数据由 Origin 软件在非线性拟合下进行处理。该免疫分析的识别性能通过交叉反应性 (CR) 值进行评估, 该值根据以下公式计算: $\text{交叉反应性} (\%) = (\text{半抗原的 } IC_{50}) / (\text{其他同源物的 } IC_{50}) \times 100\%$

4.2.6 添加回收

为了验证所建立的免疫分析方法的性能, 对 60 份鸡肉样品进行了添加回收试验。样品预处理参考 GB5009 与 Zhang 等人^[90]对动物组织的前处理。将空白鸡

肉样品在高速搅拌机中均质。在终浓度为 10、50 和 100 ng/g 的 2 g 样品中加入不同浓度的多氯联苯。加入 2 mL 去离子水和 0.5 mL 1 M HCl, 以酸化组织释放基质中结合的多氯联苯, 然后进行 37°C 水浴超声 0.5 h; 接下来, 用 0.1 mol/L 磷酸氢钾和 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值至 7.0; 添加 6.0 mL 二氯甲烷和正己烷 (1:1, v:v) 混合振荡 (30 min) 并离心 (5000×g, 10 min) 取上清液, 氮吹使其干燥。最后将一部分溶解在 2 mL 5% DMSO-PBS 中进行免疫测定; 剩余正己烷溶解, 通过 C18 和 PSA 吸附剂纯化, 0.22 μm 滤膜过滤, 进行 GC-MS/MS 分析。

4.2.7 仪器方法验证

为了验证建立方法的有效性, 样品提取物通过微量 GC 超气相色谱光谱仪进行分析, 分析条件如下^[91]。毛细管柱 HP-5 MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm, 安捷伦科技) 用于分离。氦气 (99.999%) 作为载气流速为 1 mL/min, 传输线的温度调节为 280°C。至于质谱, 在离子源温度为 300°C 的情况下, 通过电子电离 (EI) 对化合物进行碎片化。

4.3 结果

4.3.1 荧光探针的表征

如图 4.2a 所示, 通过比较裸 AIE 荧光微球、羊抗鼠 IgG 以及 AIE 荧光微球与羊抗鼠 IgG 偶联物实验中荧光值, 表明羊抗鼠 IgG 成功偶联在 AIE 微球表面。为了探究偶联前后是否对 AIE 荧光性能有所改变, 对偶联前后的 AIE 进行发射光谱扫描, 结果显示 (图 4.2b) IgG 的引入不会影响在 365 nm 激发的发射光谱。如图 4.2c 所示, 该荧光微球平均粒径为 200 nm, 球形, 表面光滑, 在溶液中分散性良好。同时对该探针的稳定性能进行探究, 分别测量扫描第一天与第 30 天的探针荧光强度, 不同储存时间的 AIEgens 微球-山羊抗鼠 IgG, 如图 4.2d 所示, 它们在储存 30 天后具有相似的荧光强度。结果表明, 该探针具有良好的稳定性和光学稳定性, 为其进一步应用提供了保证。

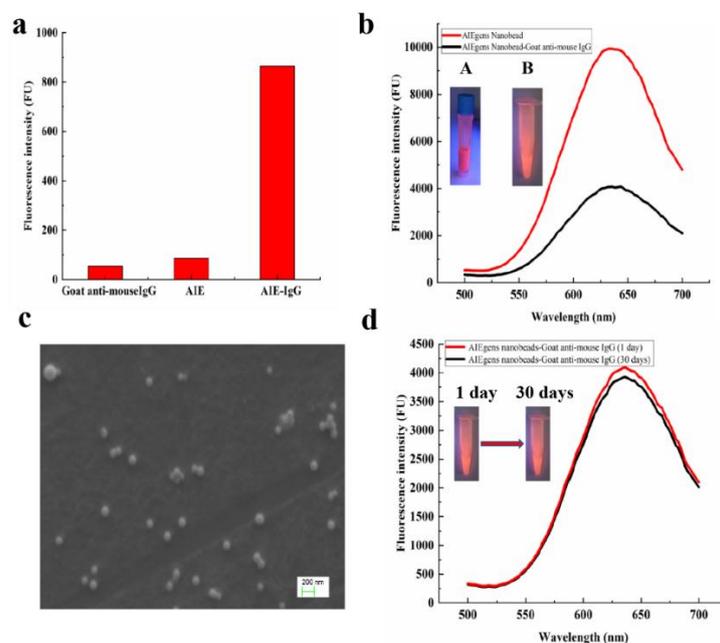


图 4.2 AIE 荧光探针的表征 (a) 探针偶联结果; (b) AIE 荧光微球偶联前后发射光谱;
(c) AIE 荧光微球 SEM 图; (d) 探针的稳定性。

Fig. 4.2 Characterization of AIE fluorescent probe (a) Coupling results of AIE and Goat Anti-Mouse IgG; (b) Emission spectra of AIE fluorescent microspheres before and after coupling; (c) SEM of AIE fluorescent microspheres; (d) Stability of probe.

采用 EDC、NHS 活泼酯法将 AIE 荧光微球和羊抗鼠 IgG 偶联, 加入不同量的羊抗鼠 IgG 合成探针, 通过测量对应的荧光值, 如图 4.3 所示, 当加入 20 μL 时探针达到饱和。

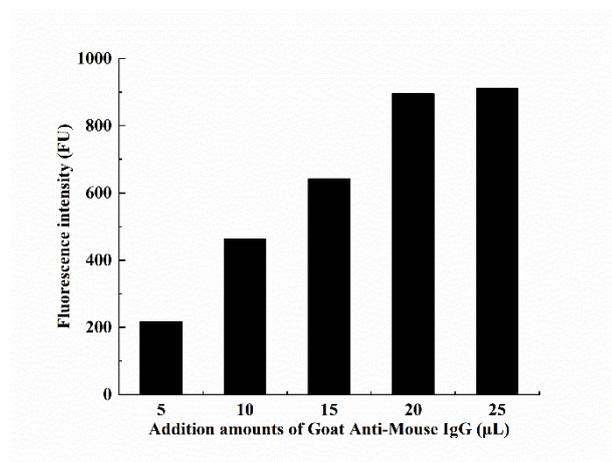


图 4.3 羊抗鼠 IgG 饱和标记量

Fig. 4.3 saturated labeling amount of Goat anti mouse IgG

4.3.2 AIE 荧光微球免疫层析试纸条

如图 4.4a 所示, C、T 线均显示荧光, 表明探针偶联成功。以 AIE-mAb 为荧光探针, 参考胶体金免疫层析试纸条的制备, 条件优化后测定 PCB80 的检测限 (图 4.4b), 裸眼 cut-off 值约 500 ng/mL, 灵敏度仍然无法达到检测要求。

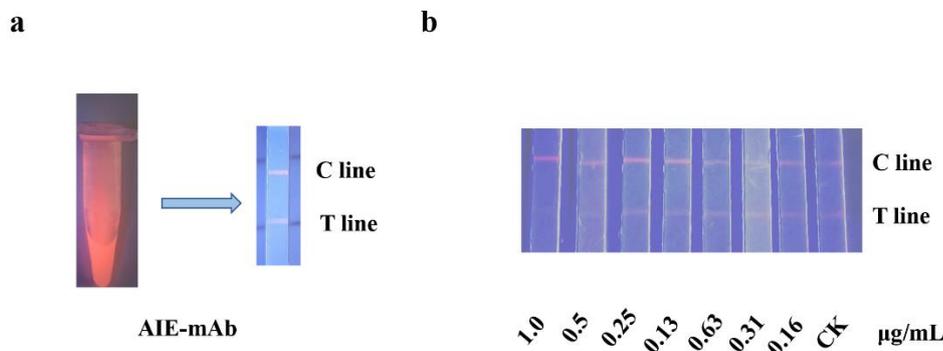


图 4.4 (a) AIE-mAb 偶联结果; (b) 试纸条对 PCB80 的检出限

Fig. 4.4 (a) AIE mAb coupling results; (b) Detection limit of test strip to PCB80

4.3.3 实验参数优化

成功制备具有强荧光信号和优越稳定性的探针后, 为了提高免疫实验性能, 优化了一些实验参数。

4.3.3.1 包被原与单克隆抗体浓度

由于荧光实验工作浓度没有类似常规 TMB 显色值 1.0 的规定, 无法按照棋盘法进行优化对比, 采用 F_{\max}/IC_{50} 作为判断依据。如图 4.5a 所示, 优化结果表明, 包被抗原和抗体的最佳工作浓度分别为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 1 $\mu\text{g/mL}$ 时 F_{\max}/IC_{50} 值最大。

4.3.3.2 免疫探针的剂量

在建立的免疫实验中, 加入不同免疫探针的剂量 (0.25、0.5、1.0、2.0 和 4.0 μL), 如图 4.5b 所示, 荧光强度随着探针量的加入而增加, 但在 1.0 μL 后, 荧光值趋于稳定即免疫反应逐渐饱和, 所以选择 1.0 μL 探针加入量。

4.3.3.3 有机溶剂浓度优化

有机溶剂浓度 (0%、2%、5%、10%和 20%二甲基亚砜), 如图 4.5c 所示, 在 5%-20%范围内, 随着有机溶剂浓度的增加, IC_{50} 明显降低。然而, 在 0-5%的

范围内显示出相反的模式。在这个竞争体系中，二甲基亚砜溶剂发挥了重要作用。它不仅有助于溶解分析物，还影响抗体的生物活性。因此，有必要在抗体耐受性和分析物溶解度之间找到合适的含量。

4.3.3.4 反应体系 pH 的优化

pH 值对检测的性能有显著影响，不同单克隆抗体的等电点有所区别，反应体系中溶液的 pH 对抗原抗体的结合性能影响显著，本实验设置了不同 pH 值（5.0、6.0、7.4、8.0 和 9.0）的反应体系。结果表明，pH 值在 5 和 9 时，明显抗体的灵敏度较低，而灵敏度在 pH 值为 7.4 时达到最大值（图 4.5d）。

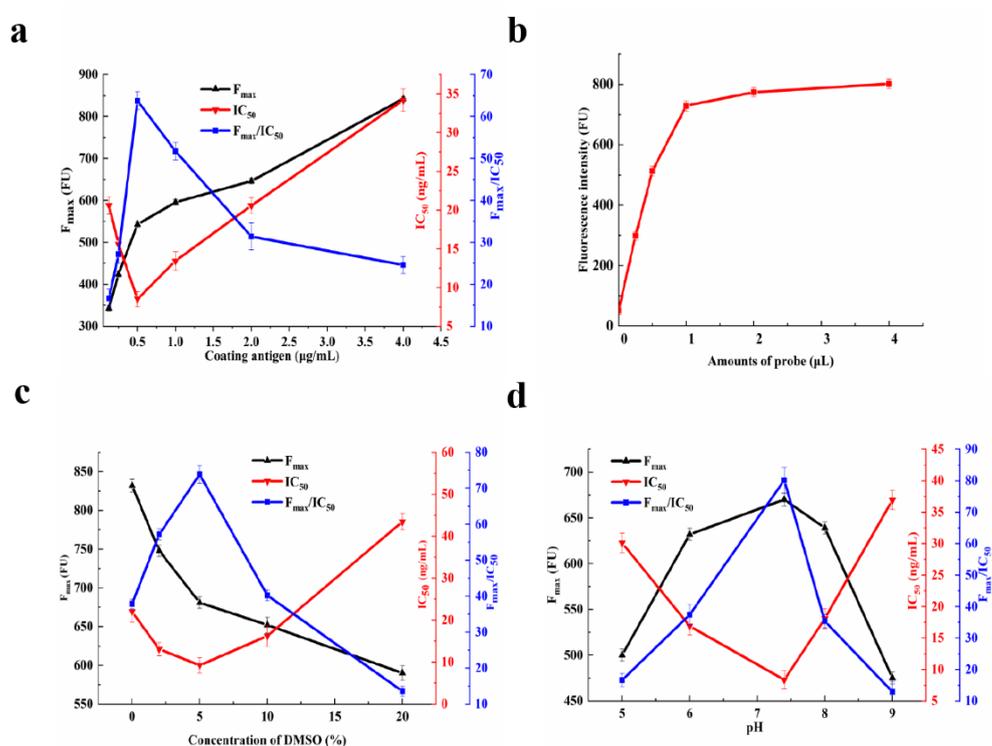


图 4.5 参数优化 (a) 工作浓度的优化; (b) 探针量的优化; (c) 溶剂含量优化; (d) 反应体系 pH 优化。

Fig. 4.5 Optimization of experimental parameter (a) Optimization of working concentration; (b) Optimization of probe quantity; (c) Optimization of solvent content; (d) Optimization of pH.

4.3.4 免疫实验的结果

在最佳实验参数条件下,对所建立的免疫分析方法的性能进行评价,检测 7 种指示物类和 12 种类二噁英类及其他多氯联苯同系物。图 4.6a 显示了 PCBc 的拟合曲线方程 $y=0.1074+0.9044/(1+148x^{0.8312})$, $R^2=0.9965$, IC_{50} 为 3.36 ng/mL。其他类似物的 IC_{50} 在 6.38 至 252.1 ng/mL。根据公式 $CR=(PCBc \text{ 的 } IC_{50}/\text{其他化合物的 } IC_{50}) \times 100\%$, 其他 PCB 化合物的交叉反应率免疫分析结果如图 4.6b 所示, PCB80 (52.66%)、PCB169 (33.27%)、PCB126 (26.09%)、PCB189 (9.52%)、PCB157 (8.98%)、PCB167 (3.04%)、PCB156 (2.79%)、PCB111 (2.56%)、PCB81 (2.23%)、PCB123 (1.35%) 和 PCB77 (1.33%)。可识别的多氯联苯的化学结构式如图 4.6c 所示。

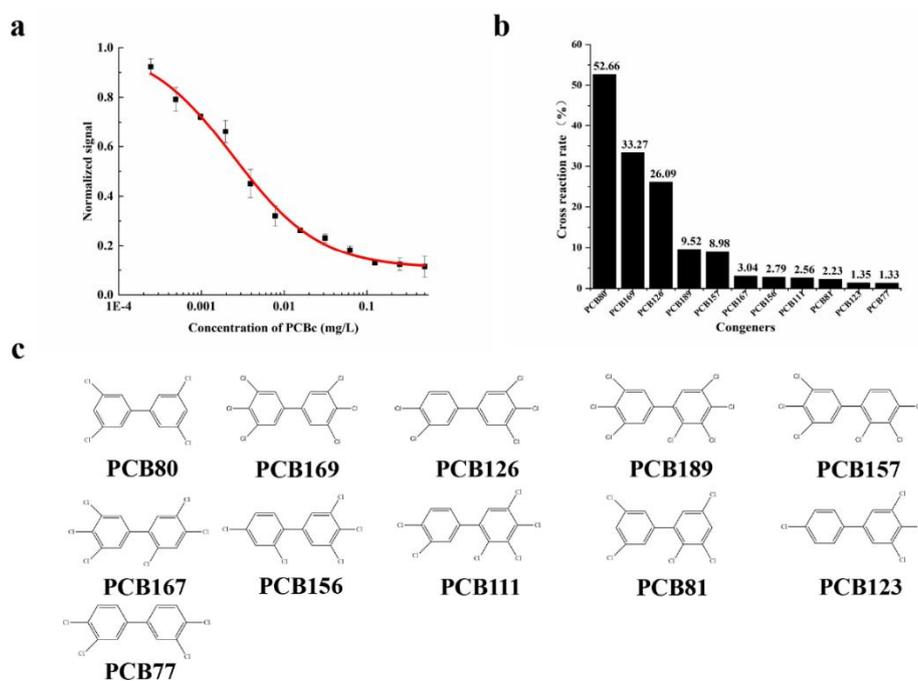


图 4.6 方法性能评价(a)半抗原标准曲线; (b)交叉反应率; (c)可识别同系物化学结构式。

Fig. 4.6 Evaluation of method performance; (a) Standard curve of haptens; (b) Cross reaction rate; (c) The chemical structural formula of homologues.

对于最低检测限值 (LOD) 如表 4.2 所示, 对 PCB80 最低检测限可达 0.32 ng/mL, 且对应其他同系物最低检测限皆大于 PCB80。

表 4.2 基于固相免疫方法多氯联苯最低检测限

Table 4.2 Limits of detection to polychlorinated biphenyls based on solid phase immunization method

分析物	LOD (ng/mL)
PCB80	0.32
PCB169	0.50
PCB126	0.33
PCB189	3.87
PCB157	3.81
PCB167	12.52
PCB156	12.83
PCB111	13.49
PCB81	21.76
PCB123	34.96
PCB77	42.15

4.3.5 基质干扰与添加回收

对于提取样品中分析物而言,预处理和纯化在消除基质干扰方面发挥重要作用,否则可能会影响分析方法的性能。分析了加标在鸡肉样品中的 PCB80 基质干扰情况。如前所述,样品提取后,使用 5% DMSO-PBS 分别对鸡肉的提取物进行梯度稀释。如图 4.7 所示,随着稀释倍数的增加,基质干扰效应明显减少。在鸡肉中稀释 20 倍时,基质干扰变得可以忽略。

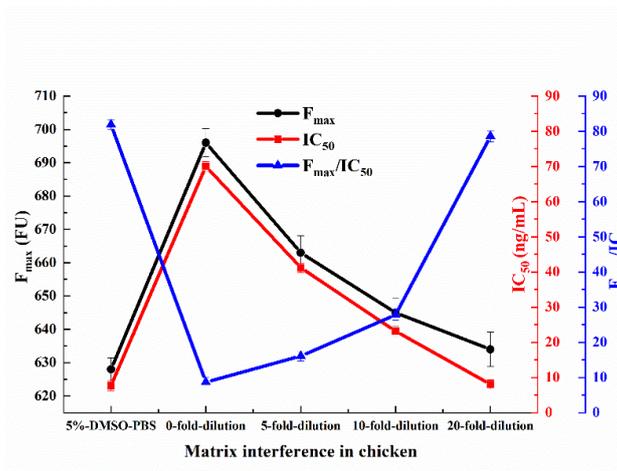


图 4.7 鸡肉中基质干扰评估

Fig 4.7 Matrix interference assessment in Chicken

根据检测灵敏度，选择浓度为 10、50 和 100 ng/g 的 PCB80、PCB126 和 PCB169 进行添加回收率实验。利用建立的基于 AIE 固相免疫方法，结果表明，回收率在 76.90%到 91.64%之间，变异系数 (CV) 值相对良好 (8.5%-13.7%)。

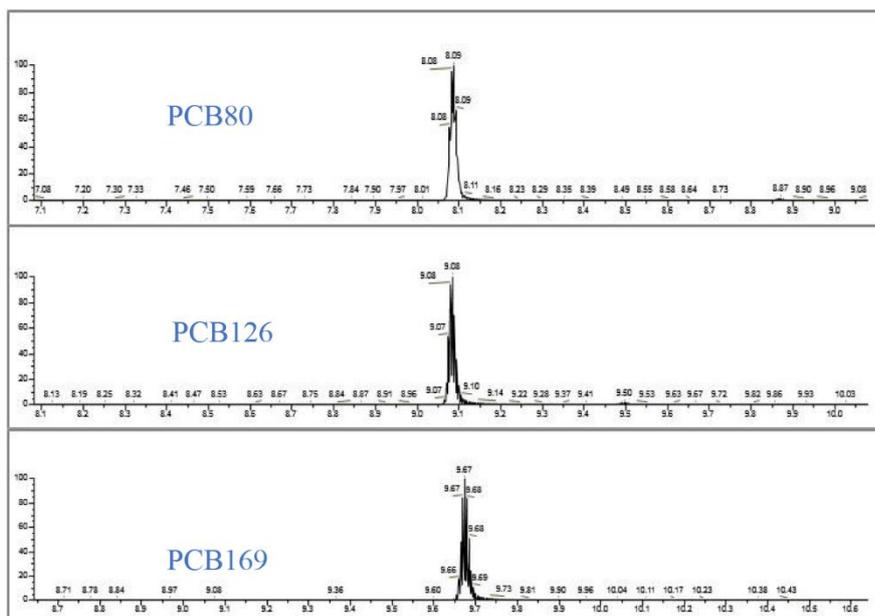


图 4.8 多氯联苯添加回收 GC-MS/MS 验证结果

Fig. 4.8 GC-MS / MS verification results of PCBs addition and recovery

此外，进一步评价所建方法的可靠性，利用 GC-MS/MS 进行方法学验证 (图 4.8)，PCB80、PCB126 和 PCB169 出峰保留时间分别为 8.09、9.09 和 9.68 min。检测结果如表 4.3 所示，固相免疫分析和 GC-MS/MS 之间具有良好的一致性，证实所建立的免疫分析方法用于分析食品中的 PCBs 残留检测具有可靠性。

表 4.3 鸡肉中多氯联苯残留检测的添加回收率

Table 4.3 Mean recovery for detecting PCBs residues in chicken meat (n=5)

Analytes	Spiked level (ng/g)	Chicken		Recovery (%)	CVs (%)
		Immunoassay	GC-MS/MS		
		Mean value (ng/g)	Mean value (ng/g)		
PCB80	10	8.46	6.10	84.60	9.3
	50	42.31	39.08	84.62	9.8
	100	91.64	85.08	91.64	10.6
PCB126	10	7.73	5.46	77.30	11.2
	50	43.57	41.88	87.14	11.3
	100	87.38	82.24	87.38	9.7
PCB169	10	8.15	5.42	81.50	8.6
	50	42.71	38.53	85.42	9.5
	100	90.32	92.44	90.32	9.1
	100	89.56	87.49	89.56	13.5

4.4 讨论

与单分子态相比,聚集态的传统有机分子的一个明显缺点是发射减弱或完全减少,这被称为聚集引起的猝灭。由两个主要因素标记,一个是阻止活跃分子内运动,另一个是形成扭曲的 3D 构象,以减少常规 ACQ 荧光团面临的 p-p 堆积相互作用^[57]。AIE 分子强抗光漂白性,强荧光信号,优异的荧光稳定性不仅提供直接产生的荧光信号,还通过优良的基于粒子的信号放大效应显著提高免疫分析的检测灵敏度。此外,比较了几种基于抗体和适配体的检测多氯联苯的生物传感器。Endo 等人^[92]开发了一种简单的微流控免疫传感器芯片,通过荧光检测来测量共面 PCB (Co-PCB),可在 30 秒内快速检测。比较基于 DNA 适体修饰的表面增强拉曼光谱 (SERS) 方法 SiO₂@Au LOD 为 292 ng/mL 的核/壳纳米颗粒^[93],我们的研究具有更好的识别能力和灵敏度。此外,一项研究表明,电化学传感器结合适配体检测 PCB77 的灵敏度可达 33 pg/L^[94]。Shimomura 等人^[95]报道

了一种新型 IgG 修饰的生物传感器，用于使用表面等离子体共振快速检测 PCB126，LOD 可达 2.5 ng/mL。然而，本研究中开发的方法可广谱筛查共平面类 PCBs 残留。

基于 TMB/HRP 的常规 ELISA 对多氯联苯 (No.80、169、126、189、157、167、156、111、81、123 和 77) 的 IC_{50} 值范围为 33.12 至 476.42 ng/mL，而所建立的基于 AIE 的荧光免疫分析提供了更高的灵敏度， IC_{50} 值范围为 6.38 到 252.1 ng/mL。这表明基于粒子信号放大效应的灵敏度提高了约 2-4 倍。此外，新建立的免疫分析法对 11 种多氯联苯的 LOD 值 (IC_{10}) 范围为 0.32 至 42.15 ng/mL。

4.5 小结

本章节建立了基于 AIE 竞争型荧光的固相免疫方法，成功偶联合成了 AIE 探针，最佳条件下，对 11 种多氯联苯 LOD 范围为 0.32-42.15 ng/mL，添加回收实验和仪器法比对结果表明所开发的竞争型具有良好的准确性和可靠性。

第五章 全文总结与展望

多氯联苯(PCBs)是含有不同数量氯原子的苯环状家族类持续性有机污染物(POPs),通过食物链富集危害人类健康,建立快速检测方法尤为重要。本实验根据 PCBs 化学结构设计合成了 3 种不同结构的半抗原并成功合成人工抗原。通过免疫、细胞融合等成功筛选到一株稳定分泌识别 11 种多氯联苯的单克隆抗体的细胞株。多氯联苯的半数抑制浓度(IC₅₀)范围为 33.12 至 476.42 ng/mL。通过 AutoDock-vina 同源建模,发现主要氨基酸结合位点一致,且 TYR 中苯环与 PCBs 中苯环形成 π - π 堆积为分子间主要作用力,其他氨基酸残基 GLU B55、ILE A2 和 ARG B45 等与 PCBs 形成氢键与卤键。

为了快速现场检测,合成 20 nm 胶体金,基于免疫学原理制备了胶体金免疫层析试纸条,由于抗体亲和力较差,在条件参数优化过程 T 线包被原浓度较高,导致对 PCBs 的识别效果差,试纸条肉眼检测最佳 Cut-off 值(临界值)为 2-5 μ g/mL。

为了提高灵敏度,基于 AIE 荧光微球设计了荧光免疫层析试纸条与 96 孔板固相免疫分析方法。结果表明,AIE 免疫层析试纸条在条件优化后测定 PCB80 肉眼 cut-off 值约 1000 ng/mL。96 孔板固相免疫分析方法对 11 种 PCBs 的检测 IC₅₀ 值从 6.38 到 252.1 ng/mL。对比传统 ELISA 方法,基于粒子信号放大效应灵敏度提高了约 2-4 倍。此外,建立的固相免疫分析法对 11 种多氯联苯的 LOD 值(IC₁₀)范围为 0.32 至 42.15 ng/mL。在鸡肉样品中进行加标,回收率为 76.90%–91.64%,变异系数为 8.5%–14.4%,表明可作为食品中 PCBs 的快速监测工具。

创新点: 本实验根据 PCBs 核心结构,设计不同结构半抗原,通过免疫、细胞融合等步骤筛选单克隆抗体。以 PCBc-KLH 为免疫原,所得单克隆抗体广谱识别 11 种 PCBs,且首次提供抗 PCBs 单克隆抗体基因序列与其 CDR 区。

不足与展望: 实验中所设计的半抗原 PCBb,以 PCBb-BSA 为免疫原,尾血评价无法识别 PCBs。以 PCBc-KLH 为免疫原,所得单克隆抗体建立免疫层析试纸条检测方法。因自身亲和力较低,检测灵敏度受限,只能作为初筛手段。后续希望通过改进半抗原结构筛选优质抗体,或者通过基因工程进行抗体基因突变改造提高相关性能。

参考文献

- [1] Fujiwara K. Environmental and food contamination with PCB's in Japan[J]. Science of the Total Environment, 1975, 4(3): 219-247.
- [2] Hsu S T, Ma C I, Hsu S, et al. Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan: a four-year followup[J]. Environmental Health Perspectives, 1985, 59: 5-10.
- [3] Covaci A, Voorspoels S, Schepens P, et al. The Belgian PCB/dioxin crisis-8 years later An overview[J]. Environmental Toxicology & Pharmacology, 2008, 25(2): 164-170.
- [4] 陈博. 美国安尼斯顿多氯联苯污染事件[J]. 世界环境, 2015, (3): 1.
- [5] 曹先仲, 陈花果, 申松梅等. 多氯联苯的性质及其对环境的危害[J]. 中国科技论文在线, 2008, (5): 7.
- [6] Bureš M, Pekárek V, Ocelka T. Thermochemical properties and relative stability of polychlorinated biphenyls[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2008, 25(2): 148-155.
- [7] 吴明媛. 多氯联苯的性质、危害及在环境中的迁移[J]. 广西水产科技, 2005, (3): 4.
- [8] Aken B V, Correa P A, Schnoor J L. Phytoremediation of polychlorinated biphenyls: new trends and promises[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(8): 2767-2776.
- [9] Dien N T, Hirai Y, Koshiha J, et al. Factors affecting multiple persistent organic pollutant concentrations in the air above Japan: a panel data analysis[J]. Chemosphere, 2021, (6): 130356.
- [10] Yuan T H, Eguchi A, Tai C J, et al. Comparison of the PCB serum levels among mother-child pairs in areas of Eastern Japan and Central Taiwan[J]. Science of the Total Environment, 2022, 806: 150272.
- [11] Qiang X A, Rqy B, Ry A, et al. Historic changes of polychlorinated biphenyls (PCBs) in juvenile and adult cetaceans from the Pearl River estuary from 2003 to 2020[J]. Science of the Total Environment, 2021, 800: 149512.
- [12] Tomza-Marciniak A, Pilarczyk B, Witczak A, et al. PCB residues in the tissues of sea ducks wintering on the south coast of the Baltic Sea, Poland[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2019, 26(11): 11300-11313.
- [13] Ren G, Yan X, Chu X, et al. Polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in mangrove sediments of Shantou, China: Occurrence, profiles, depth-distribution, and risk

- assessment[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 183(11): 109564.
- [14] Prince K D, Taylor S D, Angelini C. A Global Cross-System Meta-Analysis of Polychlorinated Biphenyl Biomagnification[J]. *Environmental Science And Technology*, 2020, 54(18): 10989-11001.
- [15] Hoogenboom L, Kan C A, Zeilmaker M J, et al. Carry-over of dioxins and PCBs from feed and soil to eggs at low contamination levels-- influence of mycotoxin binders on the carry-over from feed to eggs[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2006, 23(5): 518-527.
- [16] Mikolajczyk S, Warenik-Bany M, Maszewski S, et al. Dioxins and PCBs – Environment impact on freshwater fish contamination and risk to consumers[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 263: 114611.
- [17] Boyles E, Nielsen C K Bioaccumulation of PCBs in a wild North American felid[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2017, 98(1): 71-75.
- [18] Update of the monitoring of levels of dioxins and PCBs in food and feed[J]. *EFSA Journal*, 2012, 10(7).
- [19] Erickson M, Kaley R G Applications of polychlorinated biphenyls[J]. *Environmental Science & Pollution Research*, 2011, 18(2): 135-151.
- [20] Weber, Roland, Herold, et al. Life cycle of PCBs and contamination of the environment and of food products from animal origin[J]. *Environmental Science & Pollution Research*, 2018, 25(17): 16325-16343.
- [21] Liu L Y, Ma W L, Jia H L, et al. Research on persistent organic pollutants in China on a national scale: 10 years after the enforcement of the Stockholm Convention[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 217: 70-81.
- [22] Asif Z, Chen Z Multimedia environmental analysis of PCBs fate and transport mechanism through a case study of transformer oil leakage[J]. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 2016, 13(3): 793-802.
- [23] 赵高峰. 电子垃圾中多氯联苯的转移和潜在的健康风险[M], 中国科学院研究生院(水生生物研究所), 2006.
- [24] 初蕾. 变压器油中存在多氯联苯(PCB)的危害[J]. *电子制作*, 2015, (9Z): 1.
- [25] 陈满英, 路风辉, 刘琼等. 某典型电子垃圾拆解区大气中氯化石蜡和多氯联苯的污

- 染特征[J]. 再生资源与循环经济, 2022, 11(8): 31-36.
- [26] 白璐, 郑丙辉, 许秋瑾等. 我国华东某县饮用水源地多氯联苯的检测与风险评价[J]. 环境科学研究, 2011, 24(12): 1441-1446.
- [27] 黄智峰, 郑丙辉, 尹大强等. 洞庭湖及入湖河流中 209 种多氯联苯同类物分布特征与风险评估[J]. 环境科学, 2022, 43(01): 363-368.
- [28] 程加德, 任晓鸣, 邱阳等. 太湖上游多氯联苯的分布、来源及风险评价[J]. 生态环境学报, 2020, 29(12): 2433-2440.
- [29] Dvorak M, Fingler S, Menda G, et al. Distribution of Organochlorine Pesticide and Polychlorinated Biphenyl Residues in Lake Sediment Cores from the Plitvice Lakes National Park (Croatia)[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2019, 77(4): 537-548.
- [30] 张亚萍, 吕占禄, 王先良等. 电子垃圾拆解废渣-土壤-蔬菜中多氯联苯污染特征与健康风险评估[J]. 环境科学, 2022, 43(01): 490-499.
- [31] Li Q, Lu Y, Wang P, et al. Distribution, source, and risk of organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in urban and rural soils around the Yellow and Bohai Seas, China[J]. Environmental Pollution, 2018, 239(8): 233-241.
- [32] Awad A M, Martinez A, Marek R F, et al. Occurrence and Distribution of Two Hydroxylated Polychlorinated Biphenyl Congeners in Chicago Air[J]. Environmental Science & Technology Letters, 2016, 3(2): 47-51.
- [33] Sari M F, Esen F, Tasdemir Y Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) in honeybees and bee products and their evaluation with ambient air concentrations[J]. Atmospheric Environment, 2020, 244: 117903.
- [34] Polychlorinated Biphenyls in Food[J]. Environmental Science And Technology, 2020, 54(18): 11443-11452.
- [35] Sethi S, Keil K P, Lein P J. 3,3'-Dichlorobiphenyl (PCB 11) Promotes Dendritic Arborization in Primary Rat Cortical Neurons Via a CREB-Dependent Mechanism[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2018, 92(11): 3337-3345.
- [36] Abella V, Pérez T, Scotecce M, et al. Pollutants make rheumatic diseases worse: Facts on polychlorinated biphenyls (PCBs) exposure and rheumatic diseases[J]. Life Sciences, 2016, 157: 140-144.

- [37] Yao M, Hu T, Wang Y, et al. Polychlorinated biphenyls and its potential role in endometriosis[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 229(10): 837-845.
- [38] He Q L, Zhang L, Liu S Z Effects of Polychlorinated Biphenyls on Animal Reproductive Systems and Epigenetic Modifications[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2021, 107(3): 398-405.
- [39] Wang H, Adamcaková-Dodd A, Lehmler H-J, et al. Toxicity Assessment of 91-Day Repeated Inhalation Exposure to an Indoor School Air Mixture of PCBs[J]. *Environmental science & technology*, 2022, 56(3): 1780-1790.
- [40] Li D, Zhu J, Wang M, et al. Extraction of trace polychlorinated biphenyls in environmental waters by well-dispersed velvet-like magnetic carbon nitride nanocomposites[J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1491: 27-35.
- [41] 黄亚茹. GC/MS 分析环境样品中的多氯联苯(PCBs)[J]. *质谱学报*, 2000, 21(3): 2.
- [42] Matsumoto R, Tu N P C, Haruta S, et al. Polychlorinated biphenyl (PCB) concentrations and congener composition in masu salmon from Japan: A study of all 209 PCB congeners by high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS)[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 85(2): 549-557.
- [43] Li S, Qi J, Zhou B, et al. Sensitive determination of polychlorinated biphenyls from beverages based on switchable solvent microextraction: A robust methodology[J]. *Chemosphere*, 2022, 297: 134185.
- [44] Fba B, Aa C, Sc A, et al. Conifers as environmental biomonitors: A multi-residue method for the concomitant quantification of pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls by LC-MS/MS and GC-MS/MS[J]. *Microchemical Journal*, 2020, 154: 104593.
- [45] Gunawan F, Nishihara J, Liu P, et al. Comparison of Platform Host Cell Protein ELISA to Process-Specific Host Cell Protein ELISA[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2017, 115(2): 382-389.
- [46] Li Y, Jing Z, Wang Y, et al. Immunity Theory-Based High-Specific Monoclonal Antibody Preparation and Application of Fumonisin B1[J]. *Food Analytical Methods*, 2017, 10(13): 1-7.
- [47] Wang Z, Wen K, Zhang X, et al. New Hapten Synthesis, Antibody Production, and Indirect

Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Amantadine in Chicken Muscle[J]. Food Analytical Methods, 2017, 11(1): 302-308.

[48] Engvall E. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G[J]. Immunochemistry, 1971, 8(9): 871-874.

[49] Tsutsumi T, Amakura Y, Okuyama A, et al. Application of an ELISA for PCB 118 to the screening of dioxin-like PCBs in retail fish[J]. Chemosphere, 2006, 65(3): 467-473.

[50] Chen H Y, Zhuang H S, Yang G X, et al. Development of a new polyclonal antibody for the determination of polychlorinated biphenyls in indoor air by ic-ELISA[J]. Environmental Science&Pollution Research, 2013, 20(4): 2244-2251.

[51] 邓安平. 酶联免疫吸附分析法测定苯并(a)芘和多氯联苯[J]. 环境化学, 2006, 25(3): 4.

[52] 许艇, 高宏斌, 井宏宇等. 共面多氯联苯 ELISA 方法的建立[J]. 农业环境科学学报, 2006, (S1): 5.

[53] Chiu Y W, Carlson R E, Marcus K L, et al. A monoclonal immunoassay for the coplanar polychlorinated biphenyls[J]. Analytical Chemistry, 1995, 67(21): 3829.

[54] Franek M, Pouzar V, Kolar V. Enzyme-immunoassays for polychlorinated biphenyls: structural aspects of hapten-antibody binding - ScienceDirect[J]. Analytica Chimica Acta, 1997, 347(1-2): 163-176.

[55] 何小维, 赵喜红, 刘晓云等. 胶体金快速诊断技术的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(001): 86-88.

[56] 万宇平, 郑百芹, 贾芳芳等. 一种多氯联苯胶体金免疫快速检测试纸条的研制[J]. 中国酿造, 2021, 40(10): 5.

[57] Forster T, Kasper K E. Konzentrationsumschlag der Fluoreszenz[J]. Zeitschrift Für Physikalische Chemie, 1954, 1(5-6): 275-277.

[58] Luo J, Xie Z, Lam J W Y, et al. Aggregation-induced emission of 1-methyl-1,2,3,4,5-pentaphenylsilole[J]. Chemical Communications, 2001, (18): 1740-1741.

[59] Mei J, Leung N, Kwok R, et al. Aggregation-Induced Emission: Together We Shine, United We Soar![J]. Chemical Reviews, 2015, 115(21): 11718-11940.

[60] Xu Y, Yang W, Yao D, et al. An aggregation-induced emission dye-powered after glow luminogen for tumor imaging[J]. Chemical Science, 2020, 11(2): 419-428.

- [61] Zhang Z, Guascito M R, Wang H, et al. An Aggregation-Induced Emission-Based Indirect Competitive Immunoassay for Fluorescence "Turn-On" Detection of Drug Residues in Foodstuffs[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2019, 7: 228.
- [62] Wu w, Shen M, Liu X, et al. Highly sensitive fluorescence-linked immunosorbent assay based on aggregation-induced emission luminogens incorporated nanobeads[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 150: 111912.
- [63] Laschi S, Fránek M, Mascini M. Screen-printed electrochemical immunosensors for PCB detection[J]. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 2000, 12(16): 1293-1298.
- [64] Sun K, Huang Q, Meng G, et al. Highly Sensitive and Selective SERS Label-free Detection of PCB-77 using DNA Aptamer Modified Ag-nanorod Arrays[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8: 5723-5728.
- [65] 庄晓峰, 张宏福, 陈亮. 不同透析袋对仿生消化法评定猪饲料原料干物质和磷体外消化率的影响[J]. *动物营养学报*, 2012, (8): 7.
- [66] 张薇薇, 杨雅丽, 樊景春等. EDC/NHS 交联剂在新型生物材料磁小体修饰中的应用[J]. *甘肃中医药大学学报*, 2019, (1): 5.
- [67] 杨汶菱, 杨玲, 钟艺焯等. 油酸人工抗原的合成及其单克隆抗体的制备[J]. *中国兽医科学*, 2020, 50(11): 6.
- [68] 丁丽军, 张家禾, 周作红等. 恩诺沙星完全抗原的制备与鉴定及其多克隆抗体的制备[J]. *江西农业大学学报*, 2014, 36(3): 4.
- [69] 吕丽兰, 张娅, 邹承武等. 基于特异性对硫磷单克隆抗体的间接竞争酶联免疫吸附分析方法建立[J]. *南方农业学报*, 2020, 51(5): 8.
- [70] 刘若飞, 张萃, 葛如意等. 辛酸-硫酸铵法纯化细胞培养上清中单克隆抗体的条件优化[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29(12): 4.
- [71] 白丽. 应用 Protein G 纯化细胞培养上清中的大鼠单抗[J]. *免疫学杂志*, 1999, (03): 207-209.
- [72] Muharram M M, Abdel-Kader M S. Utilization of gel electrophoreses for the quantitative estimation of digestive enzyme papain[J]. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2017, 25(3): 359-364.
- [73] Trott O, Olson A J AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a

new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.

[74] Lan J, Wang M, Ding S, et al. Simultaneous detection of carbofuran and 3-hydroxycarbofuran in vegetables and fruits by broad-specific monoclonal antibody-based ELISA[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2019, 30(1): 1085-1096.

[75] Bai Y, Jiang H, Zhang Y, et al. Hydrophobic Moiety of Capsaicinoids Haptens Enhancing Antibody Performance in Immunoassay: Evidence from Computational Chemistry and Molecular Recognition[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 69(34): 9957-9967.

[76] Peng D, Liao F, Pan Y, et al. Development a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for screening carotenoids in eggs[J]. *Food Chemistry*, 2016, 202(1): 141-148.

[77] 王英姿, 闫剑勇, 张世伟. 基于异源包被的曲安奈德竞争酶联免疫检测方法[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(8): 5.

[78] Xu X, Xu X, Sun L, et al. An ultrasensitive colloidal gold immunosensor to simultaneously detect 12 beta (2)-adrenergic agonists[J]. *Journal of Chromatography B*, 2022: 123119.

[79] Shi C, Zhao S, Zhang K, et al. Preparation of colloidal gold immunochromatography strip for detection of methamidophos residue[J]. *Journal of Environmental Science*, 2008, (11): 6.

[80] Ye L, Xu X, Song S, et al. Rapid colloidal gold immunochromatographic assay for the detection of SARS-CoV-2 total antibodies after vaccination[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2022, 10(11): 1786-1794.

[81] 任林娇, 李晨龙, 秦自瑞等. 柠檬酸钠还原法制备金纳米颗粒的影响因素分析[J]. *功能材料*, 2021, 52(2): 5.

[82] 罗舜菁, 陈发荣, 刘成梅等. 胶体金粒径对氯霉素胶体金试纸条性能的影响[J]. *食品科学*, 2011, 32(12): 5.

[83] 孙园园, 王云龙, 李玉林等. pH 值对胶体金标记单克隆抗体性能的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, (11): 4.

[84] Feng G, Kwok R T, Tang B Z, et al. Functionality and versatility of aggregation-induced emission luminogens[J]. *Applied Physics Reviews*, 2017, 4(2): 021307.

[85] Qi C, Wang X, Chen Z, et al. Organometallic AIEgens for Biological Theranostics[J]. *Materials Chemistry Frontiers*, 2021, 5(8): 3281-3297.

- [86] Liu Z, Meng T, Tang X, et al. The Promise of Aggregation-Induced Emission Luminogens for Detecting COVID-19[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 302.
- [87] 窦磊娜, 余文博, 王战辉等. 聚集诱导发光材料在食源性致病菌免疫检测中的应用[M], 2020(第4届)抗菌科学与技术论坛.
- [88] Becheva Z R, Ivanov Y L, Mihaylova N M, et al. Fluorescent Immunoassay for Determination of Staphylococcal Enterotoxin A in Milk by Immobilized F(ab')₂ Fragment of Anti-enterotoxin A Monoclonal Antibody[J]. *Food Analytical Methods*, 2021, 14(9): 1885-1894.
- [89] A novel hapten and monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay for 3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid in edible animal tissues[J]. *Analytical Methods*, 2015, 7(16): 6588-6594.
- [90] Zhang X, Peng D, Pan Y, et al. A novel hapten and monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay for 3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid in edible animal tissues[J]. *Analytical Methods*, 2015, 7(16): 6588-6594.
- [91] Li W, Liu D, Li J, et al. Matrix Solid-Phase Dispersion Combined with GC-MS/MS for the Determination of Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Marketed Seafood[J]. *Chromatographia*, 2017, 80(5): 1-12.
- [92] Endo T, Okuyama A, Matsubara Y, et al. Fluorescence-based assay with enzyme amplification on a micro-flow immunosensor chip for monitoring coplanar polychlorinated biphenyls[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 531(1): 7-13.
- [93] Lu Y, Huang Q, Meng G, et al. Label-free selective SERS detection of PCB-77 based on DNA aptamer modified SiO₂@Au core/shell nanoparticles[J]. *Analyst*, 2014, 139(12): 3083-3087.
- [94] Liang S, Wu L, Liu H, et al. Organic molecular passivation of phosphorene: An aptamer-based biosensing platform[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 126: 30-35.
- [95] Shimomura M, Nomura Y, Wei Z, et al. Simple and rapid detection method using surface plasmon resonance for dioxins, polychlorinated biphenyls and atrazine[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 434(2): 223-230.

致谢

时光不语，三年的成长历练已然接近尾声，一路走来，跌跌撞撞，遇到过低谷，收获过成长，无论从性格、学识、思维都发生了一定的改变。

首先，感谢相遇在江苏大学与江苏省农科院，为我提供了生活和科研场所，最喜欢的是实验之余闲逛校园，看春夏秋冬、云卷云舒；感谢导师张存政对我的谆谆教导，培养逻辑、解决问题、纠正我的错误；感谢实验室的刘贝贝、刘鹏琰、李盼等师姐教我实验技能；感谢王玉龙师兄在我实验遇到问题时的指导与帮助；感谢刘娟娟、宋明珠等同学一起做实验的陪伴；感谢张宁、罗磊、方雪晨、周彤彤等师弟师妹的陪伴。

回首 20 余载，感谢父母那么多年的支持与陪伴。从一开始的乡下小学到县城的初中，对于一个乡下孩子来说能进入县城重点中学实属不易。和多数人一样熬过了高中进入了大学，忍受了考研的寂寥，再到现在的研究生生涯，被实验的不顺打击的体无完肤，还好熬了过来。一步一步向前走，承载着家人的期望，那些酸痛苦楚，经历过的人会懂。每每回想起当录取通知书寄到家里，放到父母的手中，那由衷的笑容与泪水，就会让我觉得值了。可能以后要离开学校走上社会了，希望自己能不忘初心，未来的路走下去才知道！

在学期间发表的学术论文及科研成果

[1]. 张存政,韩昌,刘娟娟,王玉龙,刘鹏琰,李盼,刘贝贝,毛欣欣. 多氯联苯单克隆抗体及其应用[P]. 江苏省: CN114014934A,2022-02-08.

[2]. Han C, Wang Y, Liu P, et al. An aggregation-induced emission immunoassay for broad detection of polychlorinated biphenyls in chicken and crab[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2022: 1-13.

[3]. Sun Y, Zhang N, Han C, et al. Competitive immunosensor for sensitive and optical anti-interference detection of imidacloprid by surface-enhanced Raman scattering[J]. Food Chemistry, 2021, 358: 129898.