



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

芘和苯并[a]芘单克隆抗体的制备及 ELISA 方法
的建立

PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODY FOR PYRENE
AND BENZO[A]PYRENE AND ESTABLISHMENT OF AN
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

研究生: 吴双敏
CANDIDATE: WU SHUANGMIN

学号: 2019302110098
STUDENT NO:

专业: 基础兽医学
MAJOR: BASIC VETERINARY MEDICINE

导师: 彭大鹏 教授
SUPERVISOR: PROFESSOR PENG DAPENG

中国 武汉
WUHAN, CHINA

二〇二二年六月
JUNE, 2022

华中农业大学硕士学位论文

芘和苯并[a]芘单克隆抗体的制备及 ELISA 方法的建立

Preparation of Monoclonal Antibody for the Pyrene and Benzo[a]pyrene and Establishment of Enzyme-linked Immunosorbent Assay

研 究 生：吴双敏

学 号：2019302110098

指 导 教 师：彭大鹏 教授

指 导 小 组：彭大鹏 教授

黄玲利 教授

王旭 教授

王玉莲 副教授

专业：基础兽医学

研究方向：兽药残留与食品安全

获得学位名称：农学硕士

获得学位时间：2022 年 6 月

华中农业大学动物科技学院动物医学院

二〇二二年六月

课题名称：茈和苯并[a]茈单克隆抗体的制备及 ELISA 方法的建立

课题来源：湖北省重点研发项目(CN) (2020BBB079)

承担单位：国家兽药残留基准实验室（华中农业大学）；农业部畜禽产品质量安全风险
评估实验室（武汉）

华中农业大学学位论文独创性声明及使用授权书

学位论文 是否保密	否	如需保密, 解密时间	年 月 日
独创性声明			
<p>本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知, 除了文中特别加以标注和致谢的地方外, 论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果, 也不包含为获得华中农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料, 指导教师对此进行了审定。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明, 并表示了谢意。</p>			
研究生签名: 吴双敏		时间: 2022年6月7日	
学位论文使用授权书			
<p>本人完全了解华中农业大学关于保存、使用学位论文的规定, 即学生必须按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版本; 学校有权保留提交论文的印刷版和电子版, 并提供目录检索和阅览服务, 可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人同意华中农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容, 为存在馆际合作关系的兄弟高校用户提供文献传递和交换服务, 同时本人保留在其他媒体发表论文的权力。</p> <p>注: 保密学位论文(即涉及技术秘密、商业秘密或申请专利等潜在需要提交保密的论文)在解密后适用于本授权书。</p>			
学位论文作者签名: 吴双敏		导师签名: 	
签名日期: 2022年6月7日		签名日期: 2022年6月7日	

注: 请将本表直接装订在学位论文的扉页和目录之间

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	III
缩略语表	VI
1 前言	1
1.1 研究背景	1
1.1.1 PAHs 简介	1
1.1.2 PAHs 的来源	1
1.1.3 PAHs 的危害	2
1.1.4 水产品中 PAHs 的残留状况	2
1.1.5 PAHs 水产品中多环芳烃的残留限量	3
1.2 PAHs 的检测技术	4
1.2.1 仪器分析法	4
1.2.2 免疫分析法	5
1.3 研究内容与目标	6
2 材料与方法	7
2.1 药品与试剂	7
2.2 仪器与设备	8
2.3 实验动物及细胞	9
2.4 主要溶液配制	10
2.5 完全抗原的合成与鉴定	11
2.5.1 免疫原 PBA-BSA 的合成	11
2.5.2 包被原 PBA-OVA 的合成	11
2.6 完全抗原的鉴定	12
2.7 免疫方案与小鼠血清监测	12
2.7.1 免疫原的乳化	12
2.7.2 免疫方案与血清监测	12
2.7.3 ELISA 操作程序	13

2.8 杂交瘤细胞的筛选.....	14
2.8.1 SP2/0 骨髓瘤细胞的制备	14
2.8.2 饲养细胞的制备.....	14
2.8.3 免疫脾细胞的制备.....	15
2.8.4 细胞融合.....	15
2.8.5 杂交瘤细胞的筛选.....	15
2.8.6 杂交瘤细胞的克隆化和建株.....	16
2.8.7 杂交瘤细胞的冻存与复苏.....	16
2.8.8 杂交瘤细胞染色体鉴定.....	16
2.8.9 杂交瘤细胞的稳定性考察.....	17
2.9 单克隆抗体的制备.....	17
2.9.1 单克隆抗体的制备.....	17
2.9.2 单克隆抗体蛋白含量测定.....	18
2.9.3 单克隆抗体效价测定.....	18
2.9.4 单克隆抗体亚型的鉴定.....	18
2.10 间接竞争 ELISA 方法的建立.....	18
2.10.1 方阵滴定.....	18
2.10.2 最佳包被浓度的确定.....	18
2.10.3 最佳抗体稀释度的确定.....	19
2.10.4 最佳竞争时间的优化.....	19
2.10.5 最佳二抗孵育时间的优化.....	19
2.10.6 标准品稀释液中有机溶剂种类及浓度的优化.....	19
2.11 间接竞争 ELISA 标准曲线的建立.....	19
2.11.1 标准曲线的建立.....	19
2.11.2 灵敏度.....	20
2.11.3 特异性.....	20
2.12 ELISA 方法的验证.....	20
2.12.1 样品前处理.....	20
2.12.2 检测限和定量限.....	20
2.12.3 回收率.....	20

2.13 方法对比考核	21
2.13.1 仪器分析方法	21
2.13.2 样品检测与方法考核	22
2.14 稳定性研究	22
2.14.1 药物标准品的稳定性	22
2.14.2 抗原的稳定性	22
2.14.3 抗体的稳定性	22
3 结果与分析	23
3.1 完全抗原的鉴定	23
3.2 血清抗体的效价	24
3.3 细胞筛选	24
3.3.1 细胞融合、克隆化及建株	24
3.3.2 4D6 杂交瘤细胞株染色体数目的测定	25
3.3.3 4D6 细胞的稳定性	25
3.3.4 单克隆抗体蛋白含量测定	26
3.3.5 单抗亚型的鉴定	26
3.4 ELISA 方法的建立	26
3.4.1 ELISA 条件的优化	26
3.4.2 标准曲线的建立	30
3.5 ELISA 方法的验证	33
3.5.1 检测限和定量限	33
3.5.2 样品的添加回收率与变异系数	33
3.6 方法对比考核	35
3.7 稳定性考察	36
3.7.1 PBA-OVA 包被原 37°C加速稳定性研究	36
3.7.2 抗体工作液 37°C加速稳定性	36
3.7.3 PYR 标准溶液 4°C长期稳定性	37
4 讨论	37
4.1 半抗原的选择	37
4.2 完全抗原的制备以及免疫效果的影响	38

4.3 免疫剂量对免疫效果的影响.....	39
4.4 免疫程序的设计.....	39
4.5 杂交瘤细胞的融合和克隆化.....	39
4.6 ic-ELISA 方法的优化.....	41
4.7 单克隆抗体的特异性.....	42
4.8 样品前处理.....	42
4.9 稳定性考察.....	44
4.10 与其他免疫检测方法的对比.....	44
5 总结.....	45
参考文献.....	46
致谢.....	55
附录.....	56
附录 I— 作者简介.....	56
附录 II—原始数据.....	57
附录 III—标准操作规程.....	63
附录 IV—答辩委员提出的相关问题和作者回答.....	68

芘和苯并[a]芘单克隆抗体的制备及 ELISA 方法的建立

摘 要

多环芳烃类化合物(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)是由多个苯环以不同的排列方式组成的有机化合物,广泛存在于环境中。人类和动物接触 PAHs 会导致多种不利影响,包括致畸性、致癌性、致突变性、遗传毒性等。目前水产品中 PAHs 的残留在全球范围内较为普遍,其在水产品中的积累不仅会对水产品的质量造成影响,而且会通过生物的体内积累对人类健康造成广泛又持久的严重危害。因此,对于水产品中 PAHs 的残留监测显得尤为重要。PAHs 的检测多为仪器分析法,虽然该方法的灵敏度较高,但检测成本高、处理步骤复杂耗时且不能进行现场检测。相对于仪器分析法,简单快速、高灵敏度、高通量以及价格低廉的免疫分析法是当今快速检测方法的主流技术,非常适合 PAHs 残留的筛选分析和现场检测。目前有关 PAHs 污染物残留的免疫分析主要集中在大气、土壤、水体样品等方面,对水产品中 PAHs 残留的免疫分析方法研究较少。因此,建立水产品中 PAHs 残留的免疫分析方法具有重要的应用价值。

本研究以芘丁酸(PBA)为半抗原,合成了不同偶联比的完全抗原,并制备了一株能够识别芘(PYR)和苯并[a]芘(BaP)的单克隆抗体。基于此抗体,建立了相应的酶联免疫检测方法,并应用于鱼、虾、蟹中 PYR 和 BaP 的残留检测。内容如下:

1. 以 PBA 为半抗原,通过碳二亚胺法(EDC)与 BSA、OVA 以不同的投料比相偶联,成功制备了不同偶联比的完全抗原。免疫原 PBA-BSA 和包被原 PBA-OVA 的偶联比分别为 8.1 (A₁)、12.8 (A₂)、18.3 (A₃)、9.4 (B₁)、11.7 (B₂)、19.2 (B₃)。

2. 将不同偶联比的免疫原按照不同剂量免疫小鼠,用不同偶联比的包被原对小鼠血清的效价及抑制情况进行监测。结果表明,以 PBA-BSA-A₃ 作免疫原,50 μg/只的剂量免疫小鼠,以 PBA-OVA-B₃ 作为包被原对小鼠血清进行监测时,其血清效价较高且抑制率较好。

3. 通过多次细胞融合及筛选,最终获得了一株能同时识别 PYR 和 BaP 的杂交瘤细胞株 4D6,该抗体的亚型为 IgG₁。对影响 ELISA 灵敏度的条件进行摸索。结果显示,以 PBA-OVA-B₃ 作为包被原,2 μg/mL 的浓度过夜包被、4D6 抗体稀释度为

1:20000、二抗工作浓度为 1:6000、20% DMF 作为竞争药物的稀释溶液时，灵敏度最高。以 PYR 为竞争药物，建立标曲。其回归方程为： $y = -54.756x + 79.143$ ， $R^2=0.9956$ ， IC_{50} 值为 3.73 ± 0.43 ng/mL ($n=5$)，线性范围为 1-16 ng/mL。该抗体对 PYR(100%)和 BaP(38%)的亲合力较高。

4. 在 ELISA 方法的应用中，PYR 和 BaP 在鱼、虾、蟹样品中的检测限(LOD)分别为 0.43-0.54 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.92-0.98 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限(LOQ)分别为 0.56-0.71 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 1.12-1.22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

5. 按照 $1\times\text{LOQ}$ ， $2\times\text{LOQ}$ ， $4\times\text{LOQ}$ 向鱼、虾、蟹空白样品中添加 PYR 和 BaP 的标准溶液。结果表明，PYR 和 BaP 在鱼、虾、蟹中的添加回收率分别为 81.5%-101.9% 和 84.9%-94.0%。在方法的对比考核中，本研究建立的 ic-ELISA 与 HPLC-FLD 的结果较一致，说明本研究建立的 ic-ELISA 方法可以作为实际样品中 PYR 和 BaP 残留检测的可靠工具。

6. 对于稳定性研究，在 4°C 条件下，PYR 标准溶液至少能保存一年。在 37°C 加速条件下，PBA-OVA 包被原能保存 8 d，相当于 4°C 保存 12 个月；4D6 抗体能稳定保存 6 d 以上，相当于 4°C 保存 9 个月。

本研究通过半抗原的选择和完全抗原合成的优化，经过多次细胞融合及克隆化筛选，获得了灵敏度较高且能同时识别 PYR 和 BaP 的单克隆抗体。由此建立的 ELISA 方法可应用于虾、蟹、鱼中的 PYR 和 BaP 残留检测。该方法弥补了水产品中 PYR 和 BaP 化合物 ELISA 检测的空白，为水产品中 PYR 和 BaP 残留检测试剂盒的研制与应用奠定了基础，在保障水产品质量安全方面具有较高的应用价值。

关键词： 苊；苯并[a]苊；单克隆抗体；酶联免疫吸附分析；水产品；残留检测

Preparation of Monoclonal Antibody for the Pyrene and Benzo[a]pyrene and Establishment of Enzyme-linked Immunosorbent Assay

ABSTRACT

Cyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are organic compounds composed of multiple benzene rings in different permutations, which widely exist in the environment. Human and animal exposure to PAHs can cause a variety of adverse effects, including carcinogenicity, teratogenicity, mutagenicity, genotoxicity. At present, the residues of PAHs in aquatic products are common in the world. The accumulation of PAHs in aquatic products will not only affect the quality of aquatic products, but also cause extensive and lasting serious harm to human health through the accumulation of organisms in vivo. Therefore, it is necessary to strengthen the monitoring of PAHs residues in aquatic products. At present, the detection of PAHs is mostly instrumental analysis. Although this method has high sensitivity, the pretreatment process is complex, time-consuming, and cannot be detected on site. Compared with instrumental analysis, immunoassay, which is the mainstream technology of rapid detection methods nowadays. It is very suitable for screening analysis and on-site detection of PAHs residues. However, the immunoassay of PAHs mainly focuses on air, soil and water samples, and there are few studies on the immunoassay of PAHs in aquatic products. Therefore, the establishment of immunoassay method for PAHs residues in aquatic products has important application value.

In this study, pyrene butyric acid (PBA) was used as hapten to synthesize complete antigens with different coupling ratios, and finally a monoclonal antibody that can recognize pyrene (PYR) and benzo[a]pyrene (BaP) was obtained. Based on this antibody, an enzyme-linked immunoassay was established and applied to detect PYR and BaP residue in fish, shrimp and crab.

1. Using PBA as a hapten, the complete antigen with different coupling ratio was successfully prepared by coupling with BSA and OVA according to carbon

diimine method (EDC). The coupling ratios of PBA-BSA and PBA-OVA were 8.1 (A₁), 12.8 (A₂), 18.3 (A₃), 9.4 (B₁), 11.7 (B₂) and 19.2 (B₃), respectively.

2. The different coupling ratio of immunogens and different doses were used to immunize mice. The titer and inhibition of mice serum were monitored with coating antigen with different coupling ratios. The results showed that when mice were immunized with PBA-BSA-A₃ as immunogen at a dose of 50 μg, and PBA-OVA-B₃ as coating antigen to monitor the serum of mice, the serum titer was higher and inhibition rate was better.

3. Through multiple cell fusion and screening, a hybridoma cell line was finally obtained, named 4D6, which could recognize both PYR and BaP. The antibody subtype was IgG₁. The ic-ELISA method was established and optimized. The results showed that when PBA-OVA-B₃ was used as the coating antigen and the concentration was 2 μg/mL, the dilution of 4D6 was 1:20000, the working concentration of the secondary antibody was 1:6000, and 20% DMF was used as the dilution solution of the competing drug, ELISA method has the highest sensitivity. Using PYR as a competitive drug, an ic-ELISA method was established. The equation was $y = -54.756x + 79.143$ ranged from 1 to 16 ng/mL, $R^2 = 0.9956$, the IC₅₀ was 3.73±0.43 ng/mL (n=5). The antibody primarily recognizes PYR (100%) and BaP (38%).

4. In the application of ELISA, the limits of detection (LOD) of PYR and BaP were 0.43-0.54 μg/kg and 0.92-0.98 μg/kg, and the limits of quantification (LOQ) were 0.56-0.71 μg/kg and 1.12-1.22 μg/kg, respectively.

5. Standard solutions of PYR and BaP were added to fish, shrimp and crab blank samples according to 1×LOQ, 2×LOQ and 4×LOQ. The results showed that the recoveries of PYR and BaP in fish, shrimp and crab were 81.5%-101.9% and 84.9%-94.0%, respectively. Compared with HPLC-FLD, the results of the two methods were consistent, which indicated that the ic-ELISA method can be used as a reliable tool for the detection of PYR and BaP residues in actual samples.

6. For stability studies, PYR standard solution could be stored at 4°C for at least one year. Under the accelerated condition of 37°C, the PBA-OVA coating antigen

could be stored for 8 d, which was equivalent to 12 months at 4°C. 4D6 antibody could be stably stored for more than 6 d, which was equivalent to 9 months stored at 4°C.

In this study, through the selection of hapten, the optimization of complete antigen synthesis, multiple cell fusion and clonal screening, a monoclonal antibody with high sensitivity and simultaneous recognition of PYR and BaP was obtained. Based on this antibody, an ic-ELISA method for the detection of PYR and BaP residue in fish, shrimp and crab was established. This method filled the gap in the immunoassay of PYR and BaP in aquatic products, laid a foundation for the development and application of PYR and BaP residue detection kits in aquatic products, and had high application value in guaranteeing quality.

Key words: Pyrene; Benzo[a]pyrene; Monoclonal antibody; Enzyme-linked immunosorbent assay; Aquatic products; Residue detection

缩略语表

英文缩写	英文全称	中文全称
BaP	Benzo[a]pyrene	苯并[a]芘
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CBS	Carbonate-buffered saline	碳酸盐缓冲液
CV	Variation coefficient	变异系数
DMF	N,N'-Dimethylformamide	N,N'-二甲基甲酰胺
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲亚砜
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide	1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺
FLT	Fluoranthene	荧蒽
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry	气相色谱-质谱法
HAT	Hypoxanthin-aminopterin-thymidin	次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶
HPLC-FLD	High performance liquid chromatography	高效液相色谱-荧光检测法
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HT	Hypoxanthine-thymidine	次黄嘌呤-胸腺嘧啶核苷
IC ₅₀	50% Inhibition concentration	半数抑制浓度
ic-ELISA	Competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay	间接竞争酶联免疫吸附分析法
LOD	Limit of detection	检测限
LOQ	Limit of quantity	定量限
NHS	N-Hydroxysuccinimide	N-羟基琥珀酰亚胺
OD	Optical density	光密度值
OVA	Ovalbumin	卵清白蛋白
PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons,	多环芳烃
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
PYR	Pyrene	芘
SERS	Surface enhanced Raman spectroscopy	表面增强拉曼光谱法
SD	Standard deviation	标准差
TMB	3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine dihydrochloride	3,3',5,5'-四甲基联苯胺二盐酸

1 前言

1.1 研究背景

1.1.1 PAHs 简介

PAHs 是由两个或两个以上的苯环组成的一系列化合物的统称(孙宇 2018)。PAHs 是亲脂性化合物, 具有低水溶性、高熔点和高沸点的特性(Alegbeleye et al 2017)。因其具有多个 π - π 键的共轭结构, 性质比较稳定(Yu et al 2012)。迄今为止, 已发现上千种 PAHs, 根据苯环数量的不同, 可将其分为“轻”PAHs (LPAHs), 由 2-4 个苯环组成; “重”PAHs (HPAHs), 4 环以上(Plaza-Bolaños et al 2010, 刘聪聪等 2021)。PAHs 容易作为颗粒物的组成成分进入大气(Faraji et al 2020), 是最早被指定为可疑致癌物的大气污染物之一(Khaiwal et al 2008)。大气中的 PAHs 在降雨的作用下会沉积到水域、植被或土壤并作长距离传输, 从而大面积污染水体、土壤等环境介质。然后通过生物的体内积累和富集, 造成广泛又持久的严重危害(Baklanov et al 2007, 尹春芹等 2018)。研究表明, PAHs 具“三致作用”以及显著的生物富集性, 是目前人类接触最多的污染物(Kim et al 2013)。由于其巨大的危害性, 美国环保局和欧盟食品科学委员会以及我国已经将 16 种 PAHs 列为优先控制污染物(Ravichandran et al 2019, 房翠兰等 2021)。

1.1.2 PAHs 的来源

PAHs 主要来源于森林大火、火山喷发等自然活动以及人类活动(Barhoumi et al 2014, Zhang et al 2020)。人类活动包括: ①食品生产过程: 人们为了追求食品的口感和延长保质期, 对食品进行煎、烤、炸、熏等高温加工, 更有可能产生和积累大量 PAHs (Silva et al 2018)。因为脂肪、蛋白质和碳水化合物在高温、热解和氧化条件下会诱导和加速产生 PAHs (Rose et al 2015)。研究发现牛肉火腿和腊肉中的 PAHs 含量最高, 可以达到 21.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 22.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (赵冰等 2012)。②汽车尾气等交通运输方面。③垃圾焚烧、石油冶炼以及沥青生产等也会产生大量的 PAHs (Jia and Batterman 2010)。这些产生的 PAHs 会释放到空气中并进行复杂的传输和转换, 最终沉积到水体、土壤、动物体和植被中, 又造成了泥土、水环境和动植物的二次污染(Zelano et al 2006, Karaca et al 2014)。

1.1.3 PAHs 的危害

PAHs 在自然界中广泛存在, 并通过多种途径在食物中积累和富集, 对人和动物造成危害。其危害主要包括致畸性、遗传毒性、致突变性、致癌性等(Ben Ameer et al 2021)。由于 PAHs 具有较高脂溶性, 在摄入和吸入后的生物利用度非常高, 因此很容易从哺乳动物的胃肠道中吸收, 并迅速分布在各组织(Hussein et al 2016)。据报道, 进入体内的 PAHs 在酶的作用下形成环氧化合物, 该化合物通过与 DNA 和蛋白质的结合(Armstrong et al 2004), 造成细胞损伤并破坏生化反应, 进而导致突变、肿瘤和癌症(Diggs et al 2011)。短期接触 PAHs, 会导致肺功能损伤, 引起哮喘和冠状动脉心脏疾病(Khaiwal et al 2008); 长期接触 PAHs 可导致肺癌、皮肤癌、胃癌等患癌风险的增加(Diggs et al 2011)。其中, BaP 已被确定为高度致癌物(David and Gooderham 2018)。由 BaP 引起的突变与肺癌之间的研究发现, 60%的肺癌病例是由 BaP 和其他一些 PAH 引起的突变造成(Denissenko et al 1996)。此外, BaP 会在子宫颈、膀胱和前列腺中诱发多种致癌反应(Verma et al 2012)。在急性和慢性健康危害方面, PAHs 可造成孕妇较高的流产率(Langlois et al 2013), 并且可通过母体对婴儿的生长产生严重的影响, 导致幼儿患病危险性增加(Edwards et al 2010)。

1.1.4 水产品中 PAHs 的残留状况

近年来, 在水环境中频繁检测到 PAHs, 包括水、鱼类、贝类、沉积物、无脊椎动物等(Unno et al 2010, Chizhova et al 2013, Miki et al 2014, Honda et al 2018)。水环境中 PAHs 的污染, 主要是由废水排放和溢油事件引起。近几十年, 世界各地发生了多起溢油事故, 大量原油被释放到水生环境中。如美国墨西哥湾发生了著名的漏油事件, 约有 490 万桶原油被排放到墨西哥湾(McNutt et al 2012)。我国在 2018 年对全国水环境中主要污染源状况进行监测表明, 在水质、沉积物、生物质量状况等方面的污染要素都含有 PAHs。由于其疏水亲脂性, PAHs 更倾向于在鱼类、虾类以及蟹类等脂肪含量高的水产品中累积(和庆 2018), 对其具有免疫毒性、胚胎异常和心脏毒性等毒性作用(Barron 2012, Snyder et al 2015, Romero et al 2018)。PAHs 在水生生物体内富集, 进一步通过食物链放大作用对人类健康造成危害(费勇等 2010)。据报道, 水产品中残留的 PAHs 主要为 3-5 环, 尤其 4 环和 5 环 PAHs 可占据雌激素受体结合位点, 并可不同程度地干扰雌激素信号通路(van et al 2005, Meng et al 2015)。PYR 和 BaP 作为 PAHs 中主要的四环和五环化合物, 在水环境中具有很强的持久性,

已知对多种水生物种具有毒性，其在水产养殖产品中的残留是影响养殖业质量安全的重要因素。

我国水产养殖业较发达，水产品贸易已成为我国重要的创汇来源(王静香等 2020)。湖北省是我国淡水养殖产量最高的省份，年产量约 500 万吨，连续多年稳居全国第一，已成为农村经济的支柱。研究发现，许多地区的水产品受到了 PAHs 的污染。汪红军等人 2016 年的研究结果显示，汉江下游 7 种鱼体内 16 种优控 PAHs 均有检出，其中 BaP 的检出率为 75%(汪红军等 2016)。秦宁等人对巢湖水产品中 PAHs 残留测定发现，16 种 PAHs 的含量为 129.33-575.31 ng/g (秦宁等 2013)。王军帅等人综述了国内长江及临近大陆的海区水产品中 PAHs 的污染情况，发现沱江富顺江段鱼类体内 16 种 PAHs 含量高达 4127.64 $\mu\text{g}/\text{kg}$, BaP 平均含量高达 343.97 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。其中，欧盟规定的 4 种 PAHs 的总含量为 748.16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，是欧盟 4 种 PAHs 最高限量的 62 倍(王军帅等 2015)。不仅我国，国外许多国家的水产品也受到了 PAHs 的污染。上个世纪 80 年代，一些沿海国家已开展 PAHs 污染水平的监测。综上所述，加强水产品中 PAHs 残留检测是大势所趋。

1.1.5 PAHs 水产品中多环芳烃的残留限量

鉴于国水产品中 PAHs 的严重污染和危害((张赢元等 2021)),我国和欧盟已经规定了水产品中 PAHs 的最大残留限量(表 1)。与国外相比，我国在限量规定上有一定差距。在水产品中 PAHs 的残留限量制定上，我国仅以 BaP 的残留量作为指标，为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。欧盟相对我国较清晰，不同种类水产品残留限量不同。欧盟规定鱼类 BaP 限量标准为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，甲壳纲和头足纲动物为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，双壳贝类为 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (张春江 2011, Yu et al 2012)。

表 1.水产品中 PAHs 的残留限量

Table 1. Maximum residue limits of PAHs in aquatic products

化合物	类型	欧盟($\mu\text{g}/\text{kg}$)	中国($\mu\text{g}/\text{kg}$)
苯并[a]芘	鱼肌肉部分(除熏鱼外)	2.0	
	甲壳纲动物、头足纲动物 (非烟薰)	5.0	5.0
	双壳贝类	10.0	

1.2 PAHs 的检测技术

1.2.1 仪器分析法

PAHs 的仪器检测方法众多, 主要包括 GC-MS (Naing et al 2020)、SERS (Zhang et al 2017) 以及 HPLC-FLD (Demetris et al 2020)。不同基质中 PAHs 的仪器检测方法见表 2。孙秀梅等采用 HPLC-FLD 法对 15 种 PAHs 进行检测, 其检测限为 0.5-2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 回收率为 71.1%-98.4% (孙秀梅等 2012)。Lu 等人从英国市场挑选了 11 种肉类产品进行 HPLC-FLD 分析, 其检测限为 0.06-0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Lu et al 2017)。GC-MS 具有定性能力强的优点, Andrés 等人采用液-液和固相萃取对食用油进行萃取和分离, 并使用 GC-MS 对 16 种 PAHs 进行定量, 检测限为 4-110 ng/kg , 回收率为 87-104%, 适用于各类食用油中 PAHs 的检测 (Andrés et al 2018)。但 GC-MS 方法对色谱柱有更高的要求。Fan 等人用 LC-MS 方法检测了尿中的 1-羟基芘。其方法的检出限为 4.85 ng/L (Fan et al 2012)。Zhou 等人为了提高灵敏度并避免复杂基质的干扰利用表面增强拉曼光谱和液液萃取结合的策略对水中 16 种典型 PAHs 进行了痕量分析, 其中葱、PYR 和 BaP 的最低检测限分别为 100、50 和 5 ng/L (Zhou et al 2020)。

表 2. PAHs 的仪器检测法

Table 2. Instrumental detection of PAHs

检测方法	PAHs	样品来源	检出限 (LOD)	定量限 (LOQ)	参考文献
HPLC-FLD	16 种 PAHs	肉制品	0.06-0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.12-0.16 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Lu et al 2017
HPLC-FLD	苯并[a]芘	熏烤水产品	0.035 ng/mL	-	章骅等 2020
HPLC-FLD	6 种 PAHs	鱼肉	0.04-0.32 $\mu\text{g}/\text{kg}$	-	Pensado et al, 2005
LC-MS	苯并[a]芘	食用油	0.1 ng/mL	-	刘玉兰等 2012
LC-MS	1-羟基芘	尿液	4.85 ng/L ,	23.4 ng/L	Fan et al 2012
GC-MS	16 种优先 PAHs	水产品	0.12-0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$	-	李阿丹等 2014
GC-MS	16 种优先 PAHs	食用油	4-110 ng/kg	-	Andrés et al 2018
SERS	葱、芘、蒽、菲	水	10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-6} 、 10^{-6} mol	-	Li et al 2020
SERS	16 种优先 PAHs	水	0.50 $\mu\text{g}/\text{L}$	-	Zhang et al 2017
SERS	葱、芘、苯并[a]芘	水	100、50 和 5 ng/L	-	Zhou et al 2020

1.2.2 免疫分析法

PAHs 的免疫分析法的原理是以抗原-抗体特异性结合对待测物进行分析的快速检测技术(詹屋强和王弘 2015, 孔蒙蒙 2019), 具有简单快速、高灵敏度和选择性等优点。主要包括金标免疫层析法(GICA)、酶联免疫法(ELISA)、电化学免疫检测(ECIA)等(见表 3)。刘波等首次建立了食用油中 BaP 的快速检测胶体金试纸条, 该方法的检测限可达 5-10 ng/mL, 该试纸条与大部分的 BaP 类似物没有交叉反应(刘波等 2016)。孟星宇制备了萘单克隆抗体并建立水体中萘残留检测的 ELISA 和 GICA 检测方法, 其检出限分别为 0.25 ng/mL 和 25 ng/mL-125 ng/mL (孟星宇 2015)。Herikstad 等人采用放射免疫测定法进行对焦炉工人尿液中的 PAHs 进行检测, 观察到尿中 PAHs 水平与其暴露水平之间存在显着相关性(Herikstad et al 1993)。

表 3. PAHs 的免疫学分析法
Table 3. Immunoassay of PAHs

半抗原	抗体	检测方法	LOD	IC ₅₀	参考文献
荧蒽	单克隆抗体	ic-ELISA	0.23 ng/mL-4.2 ng/mL	-	张天杰 2016
萘	单克隆抗体	ic-ELISA	0.25 ng/L	-	杨丽波等 2009
	单克隆抗体	ic-ELISA	2.0 ng/mL	-	孟星宇 2015
苯并芘	单克隆抗体	GICA	5-10 ng/mL	-	刘波等 2016
	单克隆抗体	ic-ELISA	4.71 ng/mL	13.74 ng/mL	邵辉锋 2014
	单克隆抗体	ECIA	0.1-300 ng/mL	-	Gobi and Miura 2004
芘	单克隆抗体	ic-ELISA	2.33 ng/mL	-	乔斌 2018
芘	单克隆抗体	ic-ELISA	-	49.5 ng/mL	孔蒙蒙 2019
	单克隆抗体	GICA	0 ng/mL-50 ng/mL	-	孟星宇 2015
	单克隆抗体	免疫荧光传感器	0.2 ng/mL	-	李鑫等 2015
芘	多克隆抗体	ic-ELISA	637.94 ng/mL	-	王男男等 2015
	单克隆抗体	ic-ELISA	0.37 ng/mL	-	乔斌 2018
菲	单克隆抗体	安培传感器	0.25-23 ng/mL	-	Fahnrich et al 2003

综上所述,虽然仪器检测法具有较高灵敏度,但样品前处理步骤较多且复杂、对设备的要求较高,这并不适合 PAHs 的现场检测。而免疫检测方法可以对大量样品同时进行分析,并且只需要少量样品(μL),大多数不需要熟练的人员。此外,免疫检测方法通常无需或只需很少的样品前处理即可检测到微量的分析物。再者,PAHs 经常在体内与生物聚合物发生反应,形成复杂的加合物,例如 PAH-DNA 加合物(Van and Gerlach 1998)。由于这些加合物的分子量较大,很难用色谱方法进行检测。而免疫分析法可以制备相应的抗体来检测这些加合物。一个典型的例子是基于苯并[a]芘-DNA 抗体的检测。已有许多文献报导了 PAHs 代谢物和加合物的免疫测定(Karsten et al 2002)。目前,ELISA 是免疫分析方法中应用较广的检测方法,具有简单、灵敏、快速等优点,大大提高了残留分析的效率,该方法在美国已经得到了很大程度的认可和应用(Epsilon and Gerlach 1995)。目前有关 PAHs 污染物残留的免疫分析主要集中在大气、土壤、水体样品等方面,对水产品中 PAHs 残留的免疫分析方法研究较少。目前市售的试剂盒对水产品的检测限较低(2.5 ng/mL)且前处理较复杂,需要专门的清洗柱和有机溶剂的提取回收率才能达到 75%。因此,建立水产品中 PAHs 残留的高灵敏度免疫分析方法具有重要的应用价值

1.3 研究内容与目标

鉴于水产品中 PAHs 的严重污染且经过食物链的放大作用对人类健康造成危害,对水产品中 PAHs 的残留检测十分必要。因此,本研究以芘丁酸为半抗原,采用碳二亚胺法以不同的投料比合成不同偶联比的人工抗原。按照不同免疫剂量和不同偶联比的免疫原免疫小鼠,考察完全抗原偶联比和免疫剂量对免疫效果的影响。经过细胞融合和克隆化,制备出能同时识别 PYR 和 BaP 的单克隆抗体。在该抗体的基础上,对影响 ELISA 灵敏度的条件以及水产品样品前处理的方法进行优化,建立适用于水产品中 PYR 和 BaP 残留检测的 ELISA 方法。最后通过与 HPLC-FLD 方法的对比考核,考察本研究建立的 ELISA 方法的准确性。

本研究旨在建立水产品中 PYR 和 BaP 残留检测的 ELISA 方法,这对进一步完善水产品中 PAHs 残留的免疫检测技术,为水产品中 PAHs 残留检测试剂盒的研制与应用奠定基础;为有效控制水产品中 PAHs 的残留,保证水产品的质量提供保障。

2 材料与方方法

2.1 药品与试剂

- 苾标准品, 98.5%, 批号 C20930000, 德国 Dr. Ehrenstorfer 有限公司。
- 苯并[a]苾标准品, 99%, 批号 C12208000, 德国 Dr. Ehrenstorfer 有限公司。
- 荧蒽标准品, 98.6%, 批号 C20635000, 德国 Dr. Ehrenstorfer 有限公司。
- 苾丁酸标准品, 99.2%, 批号 C20830000, 德国 Dr. Ehrenstorfer 有限公司。
- 蔡标准品, 99.4%, 批号 D00166068, 北京曼哈格生物科技有限公司。
- 茈标准品, 99.6%, 批号 C20505000, 德国 Dr. Ehrenstorfer 有限公司。
- 茈烯标准品, 99.1%, 批号 C20510000, 德国 Dr. Ehrenstorfer 有限公司。
- 芴标准品, 99.0%, 批号 C20800000, 德国 Dr. Ehrenstorfer 有限公司。
- 菲标准品, 99.0%, 批号 C20920000, 德国 Dr. Ehrenstorfer 有限公司。
- 蒽标准品, 99.5%, 批号 C20520000, 德国 Dr. Ehrenstorfer 有限公司。
- 苯并[a]蒽标准品, 99.8%, 批号 D0017319, 北京曼哈格生物科技有限公司。
- 蒎标准品, 99.9%, 批号 C20670000, 德国 Dr. Ehrenstorfer 有限公司。
- 苯并[b]荧蒽标准品, 99.4%, 批号 C0005335, 北京曼哈格生物科技有限公司。
- 苯并[k]荧蒽标准品, 99.6%, 批号 C0006310, 北京曼哈格生物科技有限公司。
- 二苯并[a,h]蒽标准品, 99.4%, 批号 D0015165, 北京曼哈格生物科技有限公司。
- 苯并[g,h,i]苾标准品, 95.2%, 批号 D0006310, 北京曼哈格生物科技有限公司。
- 茚并[1,2,3-cd]苾标准品, 99.4%, 批号 C20830000, 德国 Dr. Ehrenstorfer 有限公司。
- 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide, EDC), 批号 BCBJ3235U, Sigma。
- N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS), 批号 F20190603, 国药。
- N,N'-二甲基甲酰胺(N,N-Dimethylformamide, DMF), 批号 20180319, 国药。
- N,N'-二甲基乙酰胺(N,N-Dimethylacetamide), 批号 20191210, 国药。
- 乙酸乙酯, 批号 20200306, 国药。
- 二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO), 批号 20190419, 国药。
- 乙腈, 批号 200200730, 国药。
- 浓硫酸, 批号 20130506, 国药。

正己烷, 批号 20190410, 国药。

吐温-20, 批号 20190308, 国药。

鸡卵清白蛋白(ovalbumin, OVA), 批号 SLCD1615, Sigma。

牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA), 批号 20I1056678, Sigma。

弗氏完全佐剂, 批号 SLCF1289, Sigma。

弗氏不完全佐剂, 批号 SLCC7168, Sigma。

辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG(简称“二抗”), 批号 PA174421, 赛默飞世尔科技有限公司。

四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine dihydrochloride, TMB), 批号 2018122601, 武汉飞羿科技有限公司。

四丁基硼氢化胺, 批号 10716LA, Sigma。

过氧化氢脲, 批号 BCBZ5632, Sigma。

人淋巴细胞分离液, 批号 20191007, Solarbio。

RPMI-1640 基础培养基, 批号 8121483, Gibco。

胎牛血清, 批号 10099-141C, Gibco。

聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG) 50%, 批号 RNBH8345, Sigma。

青霉素-链霉素溶液(100×), 批号 J210011, Hyclone。

HAT 培养基(50×), 批号 SLCJ4475, Sigma。

HT 培养基(50×), 批号 SLCF0028, Sigma。

L-谷氨酰胺, 批号 BL549A, Biosharp。

碳酸钠(Na_2CO_3), 碳酸氢钠(NaHCO_3), 氯化钠(NaCl), 磷酸二氢钾(KH_2PO_4), 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 氯化钾(KCl), 柠檬酸, 柠檬酸三钠, 浓盐酸, 甘油均为分析纯试剂。

2.2 仪器与设备

多标记微孔板检测系统, EnVision, PerkinElmer。

紫外分光光度计, Aglient 8453 型, Aglient。

液相色谱仪: Waters 2695, 荧光检测器, Waters。

CO_2 恒温培养箱, CB210 型, Thermo。

倒置显微镜, CK-40 型, Olympus。

超净工作台, DL-CJ-2ND, 北京东联哈尔仪器制造有限公司。

超低温冰箱, PORLAR 530V 型, Angelantoni Indrstie。

分析天平, 感量 0.00001 g, AUW220D 型, Shimadzu。

分析天平, 感量 0.01 g, TMP-1 型, 湖南仪器仪表总厂天平厂。

电热鼓风干燥箱, DGX-9243B-1 型, 上海福玛实验设备有限公司。

低速离心机, TDL-40B 型, 上海安亭科学仪器厂。

高速离心机, CR21G 型, Hitachi。

氮吹仪, N-EVAPTM111, Organomation Associates。

数显恒温磁力搅拌器, HJ-3型, 常州国华电器有限公司。

透析袋, 透析分子量 8000-14000, Biosharp。

数显隔水式电热培养箱, 303As-3 型, 上海圣欣科学仪器有限公司。

微型漩涡混合仪, XW-80A 型, 上海沪西分析仪器厂有限公司。

全自动高压灭菌锅, HV-85 型, Hirayama。

自动双重纯水蒸馏器, SZ-93 型, 上海亚荣生化仪器厂。

恒温水浴锅, HH-1 型, 常州国华电器有限公司。

液氮罐, IC50RX 型, International Cryogenics。

96 孔细胞培养板, 批号 2019011, NEST。

24 孔细胞培养板, 批号 20190012, NEST。

酶标板条, 批号 AT123200722, 厦门云鹏科技发展有限公司。

Thermo 单道微量可调移液器(0.3-3 μ L, 3-30 μ L, 30-300 μ L, 100-1000 μ L)。

Thermo 十二道微量可调移液器(30-300 μ L)。

佐剂乳化器, 批号 BDYQ1001, 博奥龙。

用于细胞培养的眼科剪、镊子、匀浆器、血清瓶、刻度吸管、细胞冻存管、离心管。

2.3 实验动物及细胞

本研究中所有动物实验均经动物伦理委员会批准, 伦理编号为 HZAUMO-2021-0184, 并按照华中农业大学动物实验中心的指导方针进行。

雌性 Balb/c 小鼠(5-8 周龄)

湖南斯莱克景达实验动物有限公司

小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞

本实验室液氮保存

2.4 主要溶液配制

PYR 标准储备液: 称取 10 mg 纯度为 98.5% 的 PYR 标准品, 加入 9.85 mL DMF 溶解, 涡旋 2 min, 即为 1 mg mL^{-1} 的母液。

BaP 标准储备液: 称取 10 mg 纯度为 99% 的 BaP 标准品, 加入 9.9 mL DMF 溶解, 涡旋 2 min, 即为 1 mg mL^{-1} 的母液。

20% DMF 溶液: 量取 2 mL DMF 加入 8 mL PBS 溶液中。

磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4): 称取 NaCl 8.00 g, KH_2PO_4 0.20 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.90 g, KCl 0.20 g, 少量去离子水溶解, 定容至 1000 mL (注: 文中未注明 pH 情况下, 所述 PBS 均为 pH 7.4)。

碳酸盐缓冲液(carbonate-buffered saline, CBS, pH 9.6): 称取 Na_2CO_3 1.59 g、 NaHCO_3 2.93 g, 少量去离子水溶解, 定容至 1000 mL。

生理盐水: 称取 NaCl 9.00 g, 少量去离子水溶解, 定容至 1000 mL。

洗涤液(pH 7.4): 称取 NaCl 8.00 g, KH_2PO_4 0.20 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.90 g, KCl 0.20 g, 少量去离子水溶解, 加入 Tween 20 0.50 mL, 定容至 1000 mL。

封闭液: 称取 OVA 10.00 g, 加入 1000 mL 磷酸盐缓冲液, 搅拌混匀直至蛋白完全溶解。

15% 蔗糖溶液配制: 称取蔗糖 15 g, 少量去离子水溶解, 定容至 100 mL。

RPMI-1640 完全培养基: 于 78 mL RPMI-1640 基础培养基中加入无支原体胎牛血清 20 mL、L-谷氨酰胺溶液(100 \times) 1 mL 和青霉素-链霉素溶液(100 \times) 1 mL, 密封于 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

HAT 完全培养基: 于 98 mL 完全培养基中加入 HAT 培养基(50 \times) 2 mL, 现配现用。

HT 完全培养基: 于 98 mL 完全培养基中加入 HT 培养基(50 \times) 2 mL, 密封于 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

秋水仙素溶液: 称取秋水仙素 10 mg 溶于 100 mL 生理盐水中, 过滤分装, 于 -20 $^\circ\text{C}$ 保存。

0.075 mol/L KCl 溶液: 称取 KCl 0.56 g, 少量去离子水溶解并定容至 100 mL。

固定液: 准确量取甲醇 30 mL 和冰醋酸 10 mL, 混匀, 现配现用。

Giemsa 染色液: 1 份 Giemsa 染色液原液(甲醇 37.5 mL, 甘油 12.5 mL, Giemsa

染料 3.8 g 混合后充分溶解)与 9 份磷酸盐缓冲溶液混合, 室温放置。

底物 A 液: 称取 TMB 160 mg, 四丁基硼氢化氨 21 mg, 加入 10 ml 二甲基乙酰胺溶解混匀。

底物 B 液: 称取柠檬酸 13.70 g, 柠檬酸三钠 10.14 g 和过氧化氢脲 282.00 mg, 少量超纯水溶解, 定容至 1000 mL。

底物混合液: 吸取底物 B 液 10 mL, 加入 100 μ L 底物 A 液, 混匀, 现配现用。

终止液: 量取浓硫酸 100 mL, 缓慢滴加到 800 mL 去离子水中。

抗体稀释液、HRP 标记羊抗鼠 IgG 及稀释液均由赛默飞世尔科技有限公司提供。

2.5 完全抗原的合成与鉴定

2.5.1 免疫原 PBA-BSA 的合成

称取 45 mg PBA、20 mg NHS 和 55 mg EDC 溶解于 3 mL DMF 中, 室温搅拌 8 h, 活化液过 0.22 μ m 滤膜。称取 63 mg BSA 溶解于 9 mL PBS 中, 配成浓度为 7 mg/mL BSA 溶液。免疫原 A₁₋₃ 的制备: 分别找三个西林瓶, 各加 3 mL BSA, 依次缓慢加入 200 μ L、400 μ L、800 μ L 活化液, 边加边搅拌, 室温下搅拌过夜。然后装入透析袋, 4 $^{\circ}$ C 条件下, 在 PBS 缓冲液中透析 3-5 d, 一天换 3 次透析液。透析结束后将其分装到离心管中, 10000 r/min 离心 10 min, 弃去沉淀, 取上清液, 保存到 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。其合成路线如图 1。

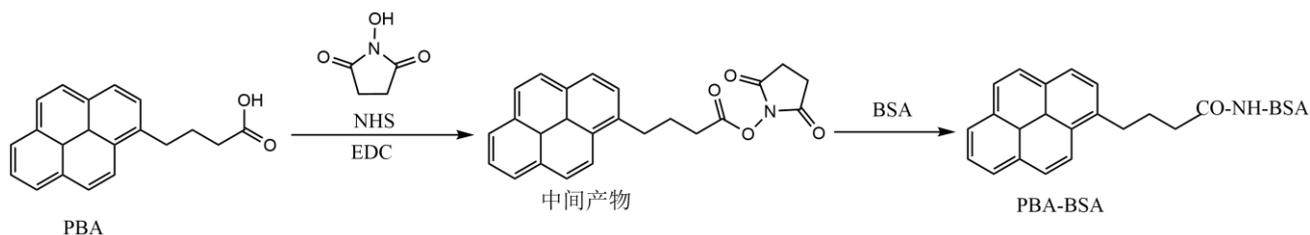


图 1 完全抗原 PBA-BSA 的合成路线

Fig.1 Synthesis of antigen PBA-BSA

2.5.2 包被原 PBA-OVA 的合成

称 45 mg OVA 溶于 9 mL CBS 中, 配成浓度为 5 mg/mL 的 OVA 溶液。检测抗原 B₁₋₃ 的制备: 取 3 个西林瓶, 分别加入 3 mL OVA 溶液, 在搅拌条件下, 然后依次加入 100 μ L、300 μ L、500 μ L 的上述活化溶液, 室温过夜搅拌。将上述混合物于 4 $^{\circ}$ C 透析 3-5 d 后离心 2 次(10000 r/min 离心 10 min), 上清液分装后, 保存到 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。其合成路线如图 2。

间接 ELISA 法检测抗体效价，测定 OD₄₅₀ 值，以 OD₄₅₀ 值约为 2.0 时的上清稀释倍数作为血清效价。用间接竞争 ELISA 方法检测血清的特异性。

表 4. 免疫方案

Table 4. Immunization Scheme

不同偶联比免疫原	组别	动物数(只)	免疫剂量(μg)
PBA-BSA-A ₁	A	3	50
	B	3	100
PBA-BSA-A ₂	A	3	50
	B	3	100
PBA-BSA-A ₃	A	3	50
	B	3	100

2.7.3 ELISA 操作程序

方阵滴定法：将包被原用碳酸盐缓冲液(CBS)倍比稀释成一系列浓度，然后将每种浓度的包被原纵向加入酶标板，各包被一列，每孔 100 μL，置于 4℃湿盒过夜包被(或 37℃孵育 2-2.5 h)。甩出包被液，拍干，每孔加 250 μL 洗涤液，静置 30 s 后，甩出洗涤液，拍干；如此重复洗涤 3 次。每孔加 250 μL 封闭液，置 37℃湿盒封闭 1 h。甩出封闭液后洗涤 3 次，拍干。每孔先加入 50 μL PBS，将血清或抗体倍比稀释成系列浓度，横向加入酶标板，每孔 50 μL。同时设阴性和空白对照，37℃湿盒孵育 30 min。甩出孔内液体，洗涤 3 次，拍干。将 HRP 标记羊抗鼠二抗用 PBS 稀释成工作浓度 1:5000，每孔 100 μL 加入酶标板，37℃湿盒孵育 30 min。甩出孔内液体，洗涤 3 次，拍干。将底物每孔 100 μL 加入酶标板，37℃湿盒孵育 15 min。加终止液，每孔 50 μL。用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值。选择 OD₄₅₀ 值 2.0 左右，与相邻孔 OD₄₅₀ 值差异较显著的孔对应的包被浓度和抗体稀释度为工作浓度。

间接 ELISA (i-ELISA)：将包被原用 CBS 稀释成用方阵滴定确定的工作浓度，100 μL/孔，置 4℃湿盒孵育 10-16 h (或 37℃孵育 2-2.5 h)。将血清或抗体用 PBS 稀释到工作浓度，每孔先加入 50 μL PBS，再加 50 μL 血清或抗体。其余操作步骤与方阵滴定法相同。

间接竞争 ELISA (ic-ELISA)：间接竞争 ELISA 法与间接 ELISA 法的程序基本相同，唯一的不同是在加入血清或抗体时应先加入 50 μL 药物或样品，再加入稀释好的 50 μL 血清或抗体，37℃湿盒孵育 30 min。

2.8 杂交瘤细胞的筛选

2.8.1 SP2/0 骨髓瘤细胞的制备

骨髓瘤细胞的复苏与活化：细胞的复苏采用快速溶解的方法。具体步骤如下：从液氮罐中取出冻存的 SP2/0 骨髓瘤细胞，用止血钳夹住冻存管，迅速投入 37℃ 水浴中剧烈晃动 1-2 min，使之迅速融化。将融化后的细胞迅速移入到装有 10 mL RPMI-1640 基础培养基的 15 mL 离心管中，混匀，1200 r/min 离心 5 min，弃去上清，用完全培养基 1 mL 重悬，将细胞转到 24 孔细胞培养板中，置 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。培养几天后，待细胞长满孔底，细胞状态较好的时候收集细胞，计数。1200 r/min 离心 5 min，弃去上清，用 RPMI-1640 基础培养基将细胞密度稀释为 1×10^6 /mL，于 Balb/c 小鼠颈背部皮下多点注射接种，每只 0.5 mL。一周后要每天观察是否有肿瘤长出。待肿瘤生长至黄豆大小时，对免疫好的小鼠连续进行冲击免疫，3 d 后进行融合。

骨髓瘤细胞的制备：取背部皮下长出骨髓瘤细胞的 Balb/c 小鼠，乙醚麻醉脱颈处死，用 75% 酒精浸泡 5 min。在超净工作台内，从背部固定小鼠，使其背部向上，取眼科剪刀镊子打开其背部皮肤，小心剪开肿瘤包膜后，用弯头眼科镊将肿瘤组织取出移至玻璃匀浆器中，加入 5 mL RPMI-1640 基础培养基，充分研磨后再加入 5 mL RPMI-1640 基础培养基，混匀，静置 2 min，吸取上层细胞悬液 8 mL 于 50 mL 离心管，补加 5 mL RPMI-1640 基础培养液至玻璃匀浆器后再转移一次。1200 r/min 离心 5 min，弃上清，用 15 mL RPMI-1640 基础培养基重悬细胞。在装有 15 mL 人淋巴细胞分离液的 50 mL 离心管中缓慢将骨髓瘤细胞悬液沿管壁滴加进去，使其呈现液体分层，1700 r/min 离心 10 min，用吸管吸走上层红色细胞悬液，然后将中层白色的骨髓瘤细胞悬液转移至另一支 50 mL 离心管中，用 10 mL RPMI-1640 基础培养基重悬细胞，用血细胞计数板计数后待用(细胞总数=25 个中方格细胞总数 $\times 10^4$ 个/mL $\times 10$ mL \times 稀释倍数)。

2.8.2 饲养细胞的制备

取一只未免疫的 Balb/c 小鼠，先将小鼠用乙醚麻醉，将其脱颈致死，用 75% 酒精浸泡 5 min，无菌条件下固定小鼠并将小鼠腹部朝上，取眼科剪刀镊子剖开整个腹部皮肤和腹膜，暴露脾脏。钝性剥离脾脏并剥离与其粘连的结缔组织，转入玻璃匀浆器中，加入 5 mL RPMI-1640 基础培养基，充分研磨后再加入 5 mL，静置 2 min，

吸取上层细胞悬液 8 mL 于 50 mL 离心管中。1200 r/min 离心 5 min, 弃上清用 10 mL RPMI-1640 基础培养基重悬细胞, 1200 r/min 离心 5 min, 弃上清, 将细胞转移至含 1% HAT 的 RPMI-1640 完全培养基中即可。

2.8.3 免疫脾细胞的制备

取冲击免疫过的 Balb/c 小鼠, 先将小鼠用乙醚麻醉, 眼眶采血之后, 将小鼠脱颈致死, 75% 酒精浸泡 5 min, 无菌条件下腹部朝上固定小鼠, 取眼科剪刀镊子剖开整个腹部皮肤和腹膜, 暴露脾脏。钝性剥离脾脏转入玻璃匀浆器中, 并剥离与其粘连的结缔组织, 转入玻璃匀浆器中, 加入 5 mL RPMI-1640 基础培养基, 充分研磨后再加入 5 mL, 静置 2 min, 吸取上层细胞悬液 8 mL 于 50 mL 离心管中, 1200 r/min 离心 5 min, 弃上清。10 mL RPMI-1640 基础培养基重悬并洗涤免疫脾细胞, 1200 r/min 离心 5 min, 重复此操作 3 次, 将细胞悬液于 37°C 5% CO₂ 培养箱中保存备用。

2.8.4 细胞融合

将骨髓瘤细胞与免疫脾细胞按 1:5-10 的比例混合于 50 mL 离心管中, 加 15 mL RPMI-1640 基础培养基充分混合, 1500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 倒扣于吸水纸上, 控干水分, 轻轻敲击管底, 使细胞松散均匀呈糊状, 置于 37°C 水浴中。将聚乙二醇(PEG) 37°C 进行预热, 然后沿管壁缓慢滴加 0.8 mL PEG, 并轻轻搅拌, 使 PEG 与细胞充分接触, 1 min 内完成整个过程。然后缓慢加入预温至 37°C 的 RPMI-1640 基础培养基, 先慢后快, 共加入 40 mL 终止融合反应。轻轻混匀细胞后, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, 移至含饲养细胞的完全培养基中, 轻轻搅拌使细胞分布均匀。将融合细胞悬液按每孔 200 μ L 接种于 96 孔细胞培养板中, 置于 37°C 5% CO₂ 培养箱中培养。

融合当天记为第 0 d, 前 3 d 尽量不要移动细胞, 第 4 d 每孔补加 100 μ L 1% HAT 完全培养基, 观察集落生长情况。第 5 d 每孔吸出 100 μ L 上清, 再补加 100 μ L 0.5% HAT 完全培养基, 继续跟踪观察融合细胞。

2.8.5 杂交瘤细胞的筛选

根据细胞的生长情况, 当细胞生长到占孔底 1/5 左右时, 检测细胞上清的效价及抑制情况(通常第 7-9 d)。取细胞培养上清, 用间接竞争 ELISA 方法进行筛选, 设置“0”孔和药物孔(首次筛选药物时 PYR 的浓度设置为 50 ng/mL, 之后克隆化时, 逐渐降低药物浓度)。与“0”孔 OD₄₅₀ 值相比, 药物孔 OD₄₅₀ 值能显著被抑制的孔判

定为阳性孔。选择几个较强的阳性孔，利用有限稀释法进行亚克隆，其余的阳性孔转入 24 孔细胞培养板进行扩大培养。

2.8.6 杂交瘤细胞的克隆化和建株

阳性杂交瘤细胞集落亚克隆的方法为有限稀释法。按照 2.8.2 制备饲养细胞，用 30 mL RPMI-1640 完全培养基(首次亚克隆使用 0.5% HT 完全培养基)悬浮。取出若干小青霉素瓶，两个一组，分别加入 3.8 mL 和 6.2 mL 含饲养细胞的完全培养基。用剪断尖端的 200 μ L 枪头在待克隆孔内吹打数次使细胞重悬，计数后在 1.5 mL 离心管中将细胞浓度稀释至 1×10^3 个/mL。吹打混匀后，吸取 200 μ L 于 3.8 mL 含饲养细胞的完全培养基中，再吸取 700 μ L 于 6.3 mL 含饲养细胞的完全培养基中，吹打混匀。每个克隆孔铺 1-2 块 96 孔细胞培养板，置 CO₂ 培养箱中培养。

克隆化第 3 d 每孔补加 1 滴完全培养基(首次亚克隆补 0.5% HT 完全培养基)，第 5 d 每孔吸出 1/2 上清，再加入 1 滴完全培养基，以后每隔 2-3 d 换一次液。观察细胞生长情况，待细胞生长至占孔底 1/5 左右时检测其上清，挑选上清效价高、形态良好且呈单集落生长的细胞集落继续亚克隆。待连续几次亚克隆阳性率为 100% 时可将细胞扩大培养并建株冻存。

2.8.7 杂交瘤细胞的冻存与复苏

杂交瘤细胞的保存与复苏采用慢冻快融的方式。具体操作如下：将 24 孔细胞培养板中的细胞孔收集至 15 mL 离心管中，计数后 1200 r/min 离心 5 min，弃上清，加入适量细胞冻存液重悬细胞并保证细胞密度为 1×10^6 个/mL 左右，每支冻存管 1 mL 作好标记。将冻存的细胞依次在 4℃ 放置 30 min，-20℃ 放置 30 min，-80℃ 过夜，最后将细胞转移到液氮罐中保存。杂交瘤细胞的复苏同骨髓瘤细胞复苏方法相同。

2.8.8 杂交瘤细胞染色体鉴定

杂交瘤细胞染色体数目的鉴定采用秋水仙素法(赵兰 2014)。取对数生长期的杂交瘤细胞(秋水仙素加入前 24-36 h 传代)，加入 100 μ g/mL 的秋水仙素溶液，使其最终浓度为 0.1-0.4 μ g/mL，继续培养 4-6 h，收集细胞于 50 mL 离心管中，1000 r/min 离心 10 min，弃上清。然后加入预温到 37℃ 的 5 mL 0.075 M KCl 溶液，将沉淀细胞悬浮，37℃ 水浴 15-20 min。加入 1 mL 新配制的固定液，1000 r/min 离心 10 min，弃上清；再加入 5 mL 固定液，将细胞悬浮，室温静置 20-30 min，1000 r/min 离心 10 min，弃上清；重复操作一次。然后加入 5 mL 固定液，将细胞悬浮，盖住盖子，置于 4℃

过夜。次日将离心管取出，1000 r/min 离心 5 min，视细胞多少留下 0.5-1 mL 固定液，将细胞悬浮并且混匀。吸取细胞悬液 1-2 滴，滴在刚从冰水中取出的干净载玻片上，轻轻吹散液滴，并在火焰上往返通过数次，使细胞平铺于载玻片上。用新鲜配制的 10% Giemsa 染色 10-20 min，再用自来水洗去染液，自然干燥。然后将载玻片浸泡在二甲苯溶液中，3 min/次，重复透明处理 3 次，最后晾干。在显微镜下，选择染色体分散好、无重叠、无失散的细胞进行观察和分析并计数。一般情况下，SP2/0 的染色体数目为 62-68 条，脾细胞则是 40 条，融合后的杂交瘤细胞染色体数应该与脾细胞和 SP2/0 细胞的染色体之和基本一致。

2.8.9 杂交瘤细胞的稳定性考察

杂交瘤细胞的稳定性考察指标主要是细胞的生长状态有无变化以及检测细胞分泌抗体的能力有无降低。细胞分泌抗体的能力主要通过细胞上清的效价和灵敏度来反映。间接 ELISA 法测定细胞上清效价，以 OD₄₅₀ 值 2.0 对应的上清稀释度作为细胞上清效价，视细胞密度及上清体积的不同，允许效价在上下 2-3 倍的范围内波动，若细胞上清的效价出现显著降低甚至消失，则视为细胞株不稳定，甚至转阴；间接竞争 ELISA 法测定细胞上清灵敏度，药物浓度设置为 PYR: 5 ng/mL，若此药物浓度下对应的抑制率显著升高甚至接近于 1，则认为该细胞分泌特异性抗体的能力降低，甚至消失。

本研究中将杂交瘤细胞反复冻融 4 次，每次复苏后传代培养 5 代，吸取细胞上清进行效价和灵敏度的检测。一旦发现细胞产生抗体的能力减弱，应及时进行克隆化，挑取能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞建株冻存。细胞稳定性实验后，将最终建株的杂交瘤细胞进行命名并液氮冻存保种，保藏于中国典型培养物保藏中心。

2.9 单克隆抗体的制备

2.9.1 单克隆抗体的制备

每只小鼠注射 0.5 mL 弗氏不完全佐剂净化，7 d 后将处于对数生长期的杂交瘤细胞收集并计数，将细胞数调整至 1×10^6 个/mL，每只小鼠腹腔注射 0.5 mL。7 d 后，每天观察小鼠腹水产生情况。待小鼠腹部明显膨大，精神变差时收集腹水，8000 r/min 离心 15 min，去掉表层脂肪，吸取上清，置 -20℃ 保存。

2.9.2 单克隆抗体蛋白含量测定

用 PBS 将腹水稀释到合适浓度后,采用 BCA Protein Quantification Kit 蛋白浓度测定试剂盒对单克隆抗体的浓度进行测定。

2.9.3 单克隆抗体效价测定

以细胞上清筛选时的最佳包被浓度包被酶标板,将腹水进行一系列倍比稀释,采用间接 ELISA 法对腹水进行效价测定。腹水效价的判定标准与细胞上清效价的判定标准一致,以 OD₄₅₀ 值为 2.0 时对应的腹水稀释度初步作为腹水的效价。

2.9.4 单克隆抗体亚型的鉴定

按照 Thermo Scientific 公司鼠单克隆抗体快速 ELISA 同型检测试剂盒的操作要求,将腹水抗体稀释 1000 倍。先后向酶标条 A-F 的 6 个孔内加入 50 μ L 稀释后的腹水和 50 μ L 羊抗鼠 IgG+IgA+IgM 辣根过氧化酶结合物,常温孵育 1h。洗涤 3 次后拍干,每孔加入 50 μ L TMB 底物,显色 15 min。用终止液 50 μ L/孔终止,用酶标仪(波长 450 nm)检测吸光度值。根据试剂盒说明书的要求对结果进行判断:吸光度值 ≥ 0.2 的孔为阳性孔,指示出抗体的亚类。

2.10 间接竞争 ELISA 方法的建立

2.10.1 方阵滴定

采用方阵滴定法初步选择抗原包被浓度和抗体稀释度。将包被原用 CBS 倍比稀释一系列浓度(8、4、2、1、0.5、0.25 μ g/mL),纵向包被酶标板条。封闭后,将 4D6 单克隆抗体用 PBS 缓冲液倍比稀释 2000、4000、8000、16000、32000、64000、128000 倍,横向加入酶标板。通过间接 ELISA 进行检测。

2.10.2 最佳包被浓度的确定

以方阵滴定法确定的几组抗原包被浓度和对应的抗体稀释度的组合进行 ic-ELISA,竞争物为标准药物。分别以竞争药物浓度的对数值为横坐标、B/B₀(以"0"孔的 OD₄₅₀ 值为 B₀,相应浓度竞争物抑制孔的 OD₄₅₀ 值为 B)为纵坐标,绘制标准曲线。根据标准曲线计算抑制率 50%时对应的竞争物浓度,即 IC₅₀ 值。以"0"孔 OD₄₅₀ 值接近 2.0、IC₅₀ 值最低时对应的包被原浓度作为抗原的最佳包被浓度。

2.10.3 最佳抗体稀释度的确定

以最佳包被浓度包被酶标板，以对应的抗体稀释度为中心，等差设计几个抗体稀释度，进行间接竞争 ELISA。绘制标准曲线，计算 IC_{50} 值。以“0”孔 OD_{450} 值接近 2.0、 IC_{50} 值最低时对应的抗体稀释度作为最佳抗体稀释度。

2.10.4 最佳竞争时间的优化

以最佳包被浓度和抗体稀释度包被酶标板，进行 ic-ELISA。固定二抗孵育时间为 40 min，将一抗孵育时间分别设置 25 min、35 min、45 min、55 min 4 个竞争时间点，做 ic-ELISA，绘制标准曲线。以“0”孔 OD_{450} 值和 IC_{50} 作为判断指标，确定最佳竞争时间。

2.10.5 最佳二抗孵育时间的优化

以最佳包被浓度和抗体稀释度包被酶标板，进行 ic-ELISA。确定最佳竞争时间后，二抗孵育时间分别设置 30 min、40 min、50 min、60 min 4 个时间点，做 ic-ELISA，绘制标准曲线，计算 IC_{50} 值。以“0”孔 OD_{450} 值和 IC_{50} 作为判断指标，确定最佳二抗孵育时间。

2.10.6 标准品稀释液中有机溶剂种类及浓度的优化

在 ELISA 反应体系中添加有机溶剂对抗原抗体结合反应的影响应尽可能小(赵妍 2020)，所以有必要探索不同浓度的有机溶剂对其结合能力的影响。有机溶剂的种类：首先研究不同有机溶剂对抗原抗体结合能力的影响。将乙腈、丙酮、DMF 和 DMSO 按体积分数 10%、20%、30% 和 40% 的水平添加到 PBS 缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4)中作为标准品稀释液。按照间接竞争 ELISA 的步骤进行，在“添加标准品”步骤中，以上述标准品稀释液分别稀释的标准品溶液进行间接竞争 ELISA，添加量为 50 μ L/孔，以标准品稀释液作为空白对照进行 ELISA 测定。

2.11 间接竞争 ELISA 标准曲线的建立

2.11.1 标准曲线的建立

以确定的 ic-ELISA 方法建立标准曲线，将竞争药物倍比稀释配制成一系列浓度，每个浓度设置 5 个平行孔。以竞争物浓度的对数值为横坐标、各浓度对应的 B/B_0 为纵坐标，绘制标准曲线，得到回归方程及相关系数。相同方法重复测定 5 批，求出 IC_{50} 平均值，并计算板内与板间变异系数，评价标准曲线的精密度。

2.11.2 灵敏度

按照标准曲线建立的方法,测定 20 份 $0 \mu\text{g L}^{-1}$ 竞争物标准溶液的 OD_{450} 值,将测定值代入标准曲线回归方程并计算对应浓度值,求出 20 份测定浓度值的平均浓度值(C)和标准差(SD)。按照公式 $Z=C+3\times\text{SD}$ (公式 2)计算 Z 值,评价标准曲线的灵敏度。

2.11.3 特异性

选择多环芳烃类其他化合物替代标准药物 PYR,并以 ic-ELISA 法进行测定,绘制标准曲线并计算 IC_{50} 。

$$\text{CR}\% = \text{IC}_{50}(\text{PYR})/\text{IC}_{50}(\text{其他 PAH 化合物})\times 100(\text{公式 3})$$

交叉反应率的高低是反映抗体特异性高低的重要指标,交叉反应率越低,说明抗体的特异性越高。

2.12 ELISA 方法的验证

2.12.1 样品前处理

将不同种类鱼肌肉、虾和蟹的可食用部位进行匀质,称取匀质好的样品 $3.0\pm 0.05 \text{ g}$ 于 50 毫升离心管中,先加入 3 mL PBS 缓冲液充分震荡均匀,再加入 2 mL 乙腈和 4 mL 乙酸乙酯,充分震荡 10 min。在 4°C 条件下,8000 r/min 的速度离心 10 min;将上层溶液全部移取, 40°C 加热下氮气吹至近干。然后用 1 mL 正己烷溶解干燥的残留物,再加入 1 mL 20% DMF 溶液强烈震荡 1 min,室温 4000 r/min,离心 5 min,除去上层液,取下层溶液进行 ic-ELISA 检测。

2.12.2 检测限和定量限

取 20 份不同来源的空白样品,按照上述样品前处理方法进行 ELISA 检测,测定 OD_{450} 值,计算空白样品 OD_{450} 值的平均值(\bar{X}),将 \bar{X} 代入标准曲线上查出对应的药物浓度(C),并计算标准差(SD)。根据公式 2 计算 Z 值,即为样品方法的检测限(LOD)。根据公式 $Q=C+10\times\text{SD}$ (公式 4)计算 Q 值,即为样品方法的定量限(LOQ)。

2.12.3 回收率

取鱼、虾、蟹样品,按照药物在测得的空白组织样品中的 $1\times\text{LOQ}$ 、 $2\times\text{LOQ}$ 和 $4\times\text{LOQ}$ 值进行添加实验,每个样品浓度设置 5 个平行样。然后进行样品处理,ELISA

方法测定药物浓度，重复 3 批，计算回收率，回收率按公式 5 计算，并计算批内和批间变异系数(公式 6)。

$$\text{回收率}(\%) = \text{实测浓度} / \text{添加浓度} \times 100\% \text{ (公式5)}$$

$$\text{变异系数}(\%) = \text{样品标准差} / \text{样品平均值} \times 100\% \text{ (公式 6)}$$

2.13 方法对比考核

2.13.1 仪器分析方法

参照鹿文婷等人建立的高效液相色谱-荧光检测法进行对比考核(鹿文婷等 2019)

色谱条件：PAH C18 反相键合固定相色谱柱，柱长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm；柱温，30℃；进样量 20 μL；流速 1.5 mL/min；激发波长为 270 nm；发射波长为 385 nm；流动相见梯度表 5。

鱼肉样品前处理：称取均质好的样品 2 g 于 50 mL 离心管中，加入 5 g 硅藻土。加入 10 mL 正己烷，涡旋振荡 30 s 后，放入 40℃ 水浴超声 30 min；以 4500 r/min 离心 5 min，吸取上清液于离心管 B 中；离心管 A 下层用 10 mL 正己烷重复提取 1 次，提取液合并于离心管 B 中，氮吹(温度控制在 35℃ 以下)除去溶剂，吹至近干。在离心管 B 中，加入 4 mL 乙腈，涡旋混合 30 s，再加入 900 mg 硫酸镁、100 mg PSA 和 100 mg C18 填料，涡旋混合 30 s，以 4500 r/min 离心 3 min，取上清液于 10 mL 玻璃刻度离心管 C 中。离心管 B 下层再用 2 mL 乙腈重复提取 1 遍，合并提取液于离心管 C 中，氮吹使溶剂近 1 mL，用乙腈定容至 1 mL，混匀后，过 0.22 μm 有机相型微孔滤膜，制得试样待测液，上机检测。

表 5. 流动相梯度表

Table 5. Gradient program of mobile phase

时间(min)	乙腈(%)	水(%)
0	50	50
5	50	50
20	100	0
30	50	50

2.13.2 样品检测与方法考核

选择鱼肉样品进行添加,分别用 HPLC-FLD 方法和本研究建立的 ELISA 方法检测。通过比较两种方法检测结果的相关性来考核 ELISA 方法的检测能力。

2.14 稳定性研究

2.14.1 药物标准品的稳定性

称取 10 mg 纯度为 98.5% 的 PYR 标准品,加入 9.85 mL DMF 配成浓度为 1 mg/mL 的标准溶液作为母液,置于 4℃ 做长期稳定性试验。每隔 2 个月取出配制成标准曲线的系列浓度做间接竞争 ELISA,每个浓度设置 5 个平行孔,绘制标准曲线并计算 IC_{50} 值。将稳定性试验组的 IC_{50} 值与新鲜试验的结果进行对比,若 IC_{50} 值明显升高或者降低(超过 1 倍),则判定药物标准溶液的活性已经下降 50%,这段时间即作为标准溶液的保质期(农医发[2005]17 号, 2005)。

2.14.2 抗原的稳定性

将 PBA-OVA 包被原按照最佳包被浓度包被一批酶标板,加入 5% 的蔗糖对其进行保护并真空包装。将处理过的酶标板放置于 37℃ 烘箱做加速试验。分别于加速第 0、2、4、6、8 d 取出酶标板做 ic-ELISA,绘制标准曲线并计算 IC_{50} 值。试验组的“0”孔 OD_{450} 值和 IC_{50} 值与新鲜试验的结果进行对比,当“0”孔 OD_{450} 值明显下降(超过 50%)或者 IC_{50} 值明显升高,则判定该酶标板生物活性已经降低了一半,这段时间即作为抗原的保质期。一般认为在 37℃ 下放置 1 d 就相当于在 4-10℃ 下保存 1.5 个月。

2.14.3 抗体的稳定性

将抗体用一抗稀释液稀释至工作浓度,放置于 37℃ 做加速稳定性试验(阿伦尼乌斯定律)。分别于加速第 0、2、4、6、8 d 取出抗体做 ic-ELISA,绘制标准曲线并计算 IC_{50} 值。将稳定性试验组的“0”孔 OD_{450} 值和 IC_{50} 值与新鲜试验的结果进行对比,当“0”孔 OD_{450} 值明显下降(超过 50%)或者 IC_{50} 值明显升高(超过 1 倍),则判定抗体工作液的生物活性已经降低一半,这段时间即作为抗体的保质期,一般认为在 37℃ 下放置 1 d 相当于 4-10℃ 下保存 1.5 个月。

3 结果与分析

3.1 完全抗原的鉴定

免疫原 PBA-BSA 的鉴定：采用紫外分光光度法对免疫原 PBA-BSA 进行鉴定，结果如图 3 所示。BSA 的最大吸收峰为 279 nm。由于 PAHs 由多个苯环组成，具有独特的紫外吸收光谱，因此半抗原 PBA 具有多个吸收峰。PBA-BSA 的紫外吸收峰与 PBA 和 BSA 相比，均发生了显著变化，并显示出 BSA 和 PBA 的吸收峰特征。初步判断免疫原 PBA-BSA 合成成功。通过公式 1 的计算，其偶联比分别为 8.1 (A_1), 12.8 (A_2), 18.3 (A_3)。

包被原 PBA-OVA 的鉴定：同样采用紫外分光光度法对包被原 PBA-OVA 进行鉴定。图 4 所示，OVA 的最大吸收峰为 280 nm。包被原 PBA-OVA 的紫外吸收峰与 PBA 和 OVA 相比，也发生了明显的变化，初步判断包被原 PBA-OVA 已成功合成。经过计算，其偶联比分别为 9.4 (B_1), 11.7 (B_2), 19.2 (B_3)。

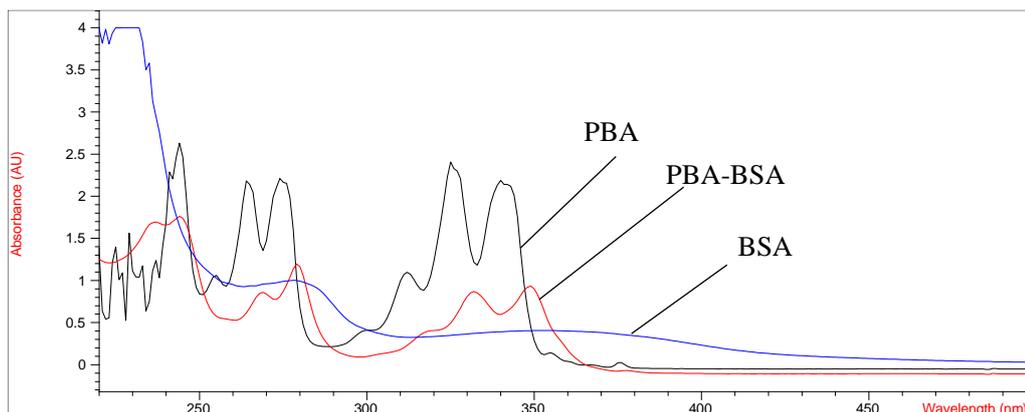


图 3 免疫原 PBA-BSA 紫外光谱图

Fig.3 The UV spectrum of PBA-BSA

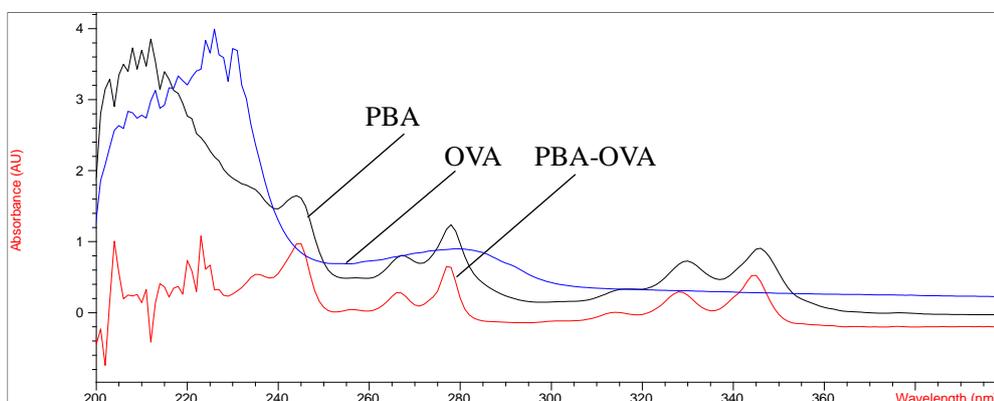


图 4 包被原 PBA-OVA 紫外光谱图

Fig.4 The UV spectrum of PBA-OVA

3.2 血清抗体的效价

为了研究不同偶联比的免疫原和免疫剂量对小鼠免疫效果的影响,本研究将不同偶联比的免疫原 PBA-BSA 按照两种不同的免疫剂量(50 μg 、100 μg)对小鼠进行免疫,四免后采用不同偶联比的包被原对小鼠血清抗体进行监测。结果表明,以不同偶联比的免疫原 PBA-BSA 免疫小鼠,用不同偶联比包被原 PBA-OVA 对小鼠进行血清监测时,其血清的效价和灵敏度随着偶联比的升高而增大。因此,免疫原 PBA-BSA-A₃ 和包被原 PBA-OVA-B₃ 为最佳组合,得到的小鼠血清效价较高且抑制率较好。对不同免疫剂量的小鼠血清抗体监测发现,100 μg 免疫剂量免疫的小鼠产生的血清效价较高,但是 50 μg 免疫剂量的灵敏度普遍要比 100 μg 的高(表 6 和附录 II 表 1)。因此,本研究选择免疫剂量为 50 μg 的小鼠进行后续的试验。

表 6 小鼠血清效价

Table 6. The titer of mice serum antibody

不同偶联比免疫原	免疫剂量 (μg)	不同偶联比包被原的血清抗体效价(1:X)								
		PBA-OVA-B ₁			PBA-OVA-B ₂			PBA-OVA-B ₃		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
PBA-BSA-A ₁	50	1600	1600	1600	1600	3200	1600	3200	3200	3200
	100	1600	3200	3200	3200	3200	6400	3200	6400	6400
PBA-BSA-A ₂	50	1600	3200	1600	3200	3200	3200	6400	6400	6400
	100	3200	3200	3200	3200	6400	6400	3200	12800	6400
PBA-BSA-A ₃	50	1600	3200	3200	3200	6400	6400	3200	6400	12800
	100	3200	3200	6400	3200	6400	12800	6400	12800	12800

3.3 细胞筛选

3.3.1 细胞融合、克隆化及建株

对免疫剂量为 50 μg , 免疫原为 PBA-BSA-A₃ 组的小鼠冲击免疫, 进行细胞融合。先采用 i-ELISA 对所有细胞上清进行检测, 选择 OD₄₅₀ 值在 1.5 以上的细胞孔。以 PYR 和 BaP 为筛选药物, 初始筛选浓度设置为 50 ng/mL, 再采用 ic-ELISA 法对阳性细胞孔进行测定。选择 B/B₀ 值较低且生长状态较好的细胞孔进行亚克隆, 随着亚克隆次数的增加, 依次降低筛选药物的浓度。经过 4 次亚克隆共筛选出 4 株抑制率较好的细胞株(表 7), 分别命名为 4A3、4D6、5D8、6H4。从表 7 可以看出, 细胞株 4D6 相对于其他三株细胞对 PYR 和 BaP 的灵敏度最高, 因此将留株保存。

表 7.4 株杂交瘤细胞的 ELISA 筛选结果

Table 7. The screening results of four hybridoma cells by ELISA

细胞孔编号	效价	OD ₄₅₀ 值			B/B ₀	
		0 孔	PYR (5 ng/mL)	BaP (5 ng/mL)	PYR (5 ng/mL)	BaP (5 ng/mL)
4A3	120	1.973	0.789	1.282	0.40	0.66
4D6	100	2.036	0.713	1.243	0.35	0.61
5D8	100	2.101	1.072	1.512	0.51	0.72
6H4	120	1.965	0.904	1.280	0.46	0.65

3.3.2 4D6 杂交瘤细胞株染色体数目的测定

通过对杂交瘤细胞株的染色体计数来判断该细胞株是否为真正的杂合体。如表 8 和图 5 所示, 4D6 细胞株的染色体数在 98-110 之间, 平均值为 102.6, 该细胞为杂交瘤细胞。

表 8. 4D6 杂交瘤细胞染色体数

Table 8. The chromosome number of 4D6 hybridoma cell

细胞株	染色体数(n=10)										平均值
4D6	102	110	98	104	106	101	99	98	102	106	102.6

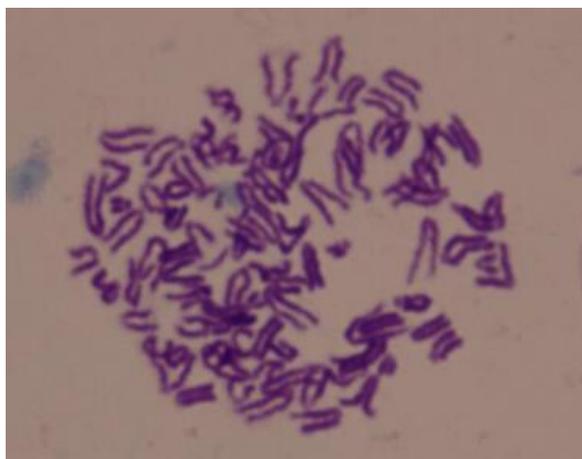


图 5 4D6 杂交瘤细胞染色体

Fig.5 The chromosome of 4D6 hybridoma cell

3.3.3 4D6 细胞的稳定性

通过反复冻融和传代对 4D6 细胞株的效价和 IC₅₀ 值进行测定来考察其稳定性。冻融前, 该细胞的效价约为 1:100, IC₅₀ 值在 4.5 ng/mL 左右。如图 6 所示, 该细胞株的效价和 IC₅₀ 值均在 100±20% 范围内, 由此可认为该细胞株的稳定性较好。

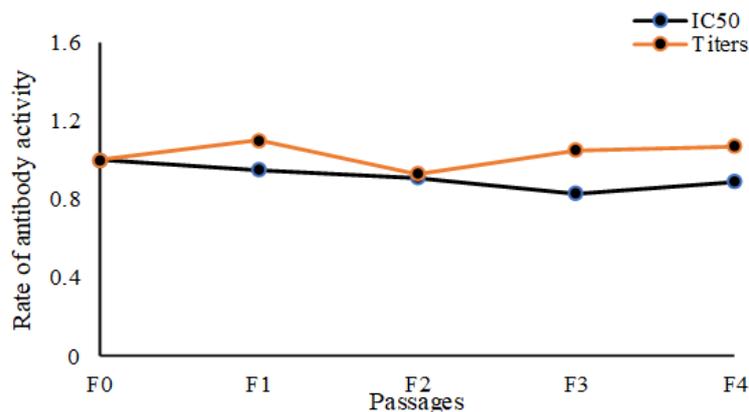


图 6 4D6 杂交瘤细胞株的稳定性
Fig.6 Stability of 4D6 hybridoma cell

3.3.4 单克隆抗体蛋白含量测定

通过 BCA 试剂盒的测定，4D6 抗体的浓度为 36.3 mg/mL。

3.3.5 单抗亚型的鉴定

在对 4D6 抗体的亚型进行鉴定时，根据试剂盒的判定标准，吸光度值 ≥ 0.2 即为阳性。结果如图 7 所示，4D6 抗体的亚型为 IgG₁。

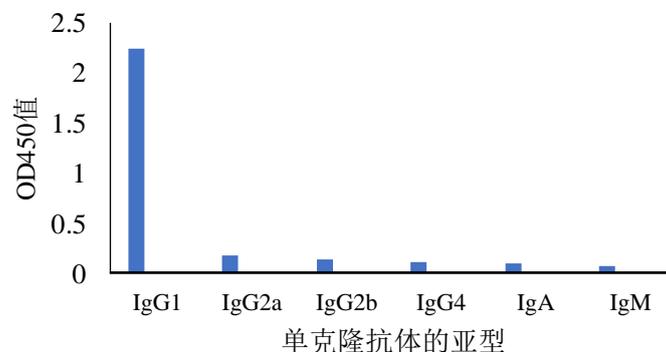


图 7 4D6 抗体亚型的鉴定
Fig.7 Subtype identification of 4D6 monoclonal antibody

3.4 ELISA 方法的建立

3.4.1 ELISA 条件的优化

方阵滴定 如表 9 所示，当 PBA-OVA 浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ ，抗体稀释倍数为 8000 以及 PBA-OVA 浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ ，抗体稀释倍数为 16000 时，OD₄₅₀ 值均在 2.0 左右且与邻孔差距较大，所以初步确定(1, 8000)和(2, 16000)这两个组合为较优组合，再进行下一步的优化。

表 9. 4D6 单克隆抗体方阵滴定
Table 11. Square titration of 4D6 monoclonal antibody

4D6 抗体稀释 度(1:X)	PBA-OVA 包被原浓度($\mu\text{g/mL}$)					
	8	4	2	1	0.5	0.25
2000	2.364	2.408	2.360	2.271	2.140	1.814
4000	2.314	2.355	2.304	2.207	1.949	1.718
8000	2.254	2.295	2.204	2.086	1.821	1.550
16000	2.174	2.201	2.183	1.763	1.583	1.299
32000	1.849	1.765	1.488	1.291	1.191	0.874
64000	1.071	1.051	0.979	0.921	0.881	0.689
128000	0.620	0.592	0.601	0.524	0.503	0.436

最佳包被浓度 以上述初步确定的最佳组合(1, 8000)和(2, 16000), 采用 ic-ELISA 法分别作标准曲线。将 PYR 浓度设置为 0、1、2、4、8、16 ng/mL, 计算其 IC_{50} 值。当 PBA-OVA 的浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 时, IC_{50} 值最低, 所以 PBA-OVA 的最佳包被浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ (见表 10)。

表 10. 包被浓度的确定
Table 10. Determination of coating concentration

抗体稀释倍数	包被浓度($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} 值(ng/mL)	空白孔 OD_{450} 值
8000	1	5.7	1.993
16000	2	4.9	2.205

最佳抗体稀释度 如表 11 所示, 当抗体稀释 28000 倍时, IC_{50} 最低, 但是其“0”孔 OD_{450} 值也较低。根据“0”孔 OD_{450} 值在 2.0 左右且 IC_{50} 值较低的筛选原则, 最终选择稀释 20000 倍作为最佳抗体稀释度。

表 11. 抗体稀释度的确定

Table 11. Determination of antibody dilution

抗体稀倍数	IC ₅₀ 值(ng/mL)	空白孔 OD ₄₅₀ 值
16000	4.7	2.214
20000	4.1	2.085
24000	5.2	1.753
28000	3.8	1.561

最佳孵育时间 固定上述优化的条件，一抗、二抗孵育时间均设置四个时间点，采用 ic-ELISA 来确定最佳孵育时间。结果表明，当一抗孵育 35 min、二抗孵育 40 min 时，灵敏度最高(表 12)。

表 12. 孵育时间的确定

Table 12. Determination of incubation time

条件	孵育时长(min)	空白孔 OD ₄₅₀ 值	IC ₅₀ 值(ng/mL)
一抗孵育时间	25	1.897	4.9
	35	2.003	4.1
	45	2.103	5.6
	55	2.116	6.1
二抗孵育时间	30	1.902	4.6
	40	2.032	3.9
	50	2.133	4.9
	60	2.157	5.3

最佳二抗浓度 从表 13 的结果可以看出，当二抗的工作浓度为 1:6000 时，“0”孔 OD₄₅₀ 值在 2.0 左右且其 IC₅₀ 最低，为 4.3 ng/mL。此浓度下 ELISA 方法的灵敏度最高，所以最佳二抗工作浓度为 1:6000。

表 13. 二抗浓度的确定

Table 13. Determination of secondary antibody concentration

二抗稀释倍数	空白孔 OD ₄₅₀ 值	IC ₅₀ 值(ng/mL)
5000	2.268	5.6
6000	2.037	4.3
7000	1.832	4.9
8000	1.597	4.6

有机溶剂的优化 为了研究不同有机溶剂对 ELISA 灵敏度的影响，采用 DMF、丙酮、乙腈和 DMSO 四种溶剂进行优化。在试验过程中，我们发现丙酮的挥发性很强。当在 37℃ 孵育时，板条中的液体挥发，总体积减少，结果不可用，故排除。从图 8 可以看出，与乙腈相比，DMF 和 DMSO 的 OD₄₅₀ 值受到的影响相对较小。如表 14 所示，不同体积分数 DMF 和 DMSO 的灵敏度有较大差异。当使用 20% DMF 进行 ic-ELISA 时，IC₅₀ 值最低。因此，我们选择体积分数为 20% 的 DMF 作为标准品稀释液。从上述优化的结果可以看出，一定体积分数的有机溶剂作为标准品稀释液时，确实可以微调 ic-ELISA 的灵敏度。

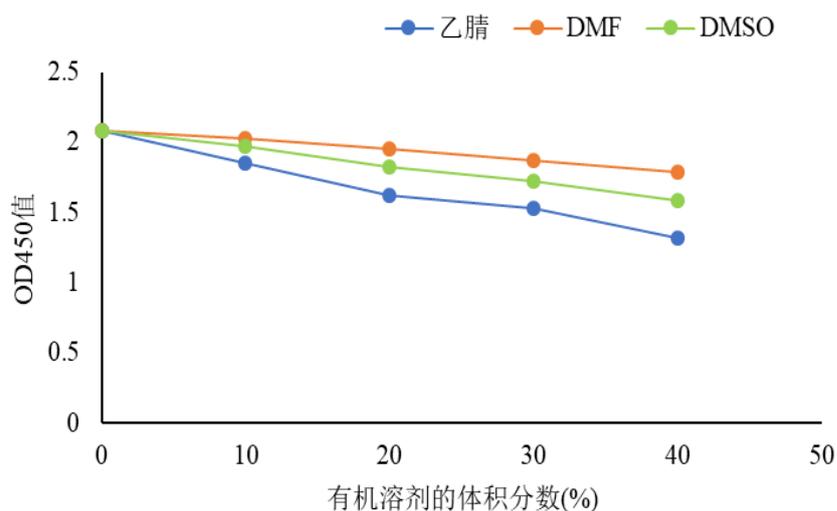


图 8 不同体积分数的有机溶剂的影响

Fig.8 Influence of different volume fractions of organic solvents

表 14. 不同体积分数的 DMF 和 DMSO 的比较

Table 14. Comparison of DMF and DMSO with different volume fractions

有机溶剂	体积分数(%)	"0" 孔 OD ₄₅₀ 值	IC ₅₀ (ng/mL)
DMF	10	2.152	4.71
	20	2.023	3.53
	30	1.875	4.32
	40	1.731	3.89
DMSO	10	2.002	5.07
	20	1.871	5.73
	30	1.681	5.33
	40	1.577	6.56

3.4.2 标准曲线的建立

将 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 PYR 标准溶液用 20% DMF 的稀释液稀释成 5 个浓度, 分别为 1.0、2.0、4.0、8.0 和 16.0 ng/mL , 建立标准曲线。如图 9 所示, 以 B/B_0 为 Y 轴, 药物浓度的对数值为 X 轴, 其回归方程为 $y = -54.756x + 79.143$, $R^2 = 0.9956$, IC_{50} 值为 3.73 ± 0.43 ng/mL ($n=5$), 线性范围为 1-16 ng/mL 。

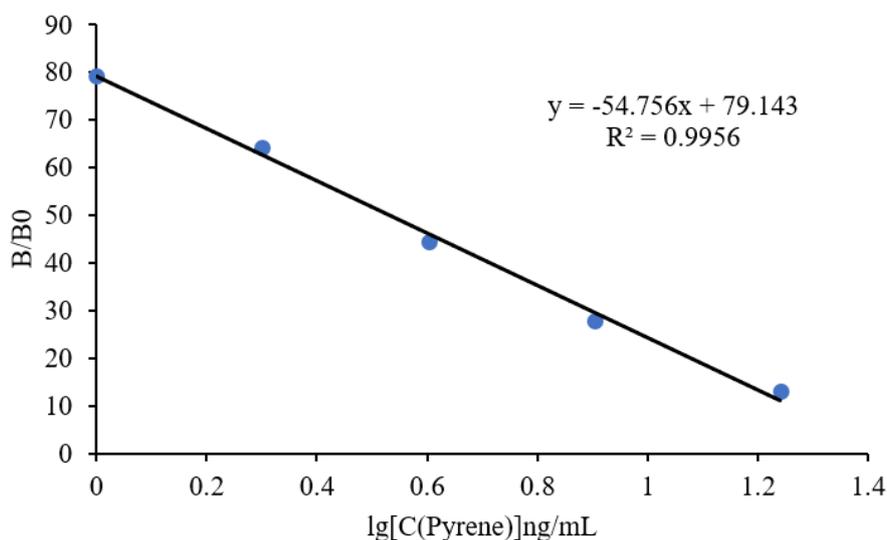


图 9 PYR ic-ELISA 标准曲线

Fig.9 Standard curve of ic-ELISA for PYR

精密度 通过板内和板间变异系数(CV)的测定来反映本研究方法的精密度。从表 15 可以发现, 板内 CV 小于 11.4%, 板间 CV 小于 8.5%, 精密度较好。

表 15. 板内与板间变异系数

Table 15. Coefficient of variability of intra-assay and inter-assay

PYR (ng/mL)	实测值 (ng/mL)	板内 CV (%)	实测平均值 (ng/mL)	板间 CV (%)
1	1.02±0.061	6.1	1.03 ± 0.088	8.5
	1.09±0.081	7.4		
	1.02±0.09	9.3		
	0.96±0.11	11.4		
	1.04±0.06	6.4		
2	2.08±0.082	3.9	1.98±0.13	6.6
	1.93±0.16	8.3		
	1.88±0.16	8.5		
	2.02±0.070	3.5		
	1.98±0.11	5.6		
4	4.07±0.16	3.9	4.06±0.24	5.9
	3.94±0.22	5.6		
	4.12±0.34	8.3		
	4.21±0.31	7.5		
	3.96±0.11	2.8		
8	7.90±0.37	4.7	7.96±0.32	4.0
	7.95±0.16	2.0		
	7.93±0.54	6.8		
	7.99±0.29	3.6		
	8.03±0.19	2.4		
16	15.87±0.632	4.0	16.02±0.49	3.1
	16.09±0.59	3.7		
	15.93±0.43	2.7		
	16.06 0.55	3.4		
	16.15±0.34	2.1		

灵敏度如表 16 所示, 20 份 0 ng/mL 溶液的实测平均值为 0.395 ng/mL, 标准差为 0.0265 ng/mL, 根据公式 $Z=C+3\times SD$ 计算, 其灵敏度为 0.475 ng/mL。

表 16. ic-ELISA 的灵敏度

Table 16. Sensitivity of the ic-ELISA

PYR (ng/mL)	标准曲线 OD ₄₅₀ 值					空白溶液的实测值				实测平均值 (ng/mL)	SD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
	1	2	3	4	5	(20 份, ng/mL)						
0	2.089	2.121	2.034	2.104	2.016	0.381	0.352	0.361	0.35			
1	1.545	1.671	1.549	1.561	1.541	0.401	0.423	0.409	0.369			
2	1.329	1.321	1.312	1.407	1.364	0.429	0.41	0.389	0.424	0.395	0.0265	0.475
4	1.132	1.041	1.041	1.024	0.927	0.389	0.378	0.424	0.387			
8	0.728	0.715	0.636	0.742	0.706	0.442	0.413	0.377	0.385			
16	0.415	0.429	0.372	0.439	0.393							

特异性 将 16 种 PAHs 的标准品配成一系列浓度, 根据其 IC₅₀ 值计算交叉反应率。由表 17 可知, 4D6 单克隆抗体与 PYR (100%) 和 BaP (38%) 的亲和力较高, 与荧蒽(8%)的亲和力较低, 与其他多环芳烃的交叉反应小于 1%, 可忽略不计。

表 17. 4D6 单克隆抗体对 PAHs 类化合物的交叉反应率

Table 17. Cross-reactivity of 4D6 monoclonal antibody to PAHs compounds

标准品	IC ₅₀ (ng/mL)	CR(%)
芘	3.73	100
苯并[a]芘	9.71	38
荧蒽	45.83	8
萘	>373	<1
蒽	>373	<1
蒽烯	>373	<1
芴	>373	<1
菲	>373	<1
蒽	>373	<1
苯并[a]蒽	>373	<1
蒽	>373	<1
苯并[b]荧蒽	>373	<1
苯并[k]荧蒽	>373	<1
二苯并[a,h]蒽	>373	<1
苯并[g,h,i]花	>373	<1
茚并[1,2,3-cd]芘	>373	<1

3.5 ELISA 方法的验证

3.5.1 检测限和定量限

取 20 份来自不同地区的鱼、虾、蟹空白样品，按照 2.12.1 的方法进行处理并采用本研究建立的方法进行检测。将测定值代入标准曲线，计算出鱼、虾、蟹空白样品的实际浓度平均值，根据公式 2 和公式 4 计算各个样品的 LOD 和 LOQ，结果如表 18 所示。PYR 和 BaP 在鱼、虾、蟹样品中的 LOD 分别为 0.43-0.54 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.92-0.98 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，LOQ 分别为 0.56-0.71 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 1.12-1.22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表 18. PYR 和 BaP 在水产品中的检测限和定量限

Table 18. LODs, LOQs of PYR and BaP in aquatic products

药物	样品	空白样品实测平均值	SD	LOD	LOQ
		(20 份, $\mu\text{g}/\text{kg}$)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)
PYR	鱼	0.48	0.021	0.54	0.69
	虾	0.37	0.019	0.43	0.56
	蟹	0.45	0.026	0.53	0.71
BaP	鱼	0.91	0.024	0.98	1.15
	虾	0.83	0.029	0.92	1.12
	蟹	0.85	0.037	0.96	1.22

3.5.2 样品的添加回收率与变异系数

鱼肉样品的添加回收率: 按照 $1\times\text{LOQ}$, $2\times\text{LOQ}$, $4\times\text{LOQ}$ 的定量限向鱼肉样品中依次添加 PYR 和 BaP 标准溶液，计算鱼肉样品的回收率和批内批间变异系数，结果如表 19 所示。PYR 和 BaP 在鱼肉中的添加浓度均为 2 ng/mL 、4 ng/mL 、8 ng/mL 。PYR 在鱼肉样品中的平均回收率为 81.5%-93.7%，批内和批间 CV 小于 8.9%；BaP 在鱼肉中的平均回收率为 84.9%-89.2%，批内和批间 CV 小于 8.2%。

表 19. PYR 和 BaP 在鱼肉中的添加回收率

Table 19. Recoveries of PYR and BaP in fish

标准品	添加量 (ng/mL)	回收率(%) (C±SD)	批内 CV(%) (n=5)	平均回收率(%) (C±SD)	批间 CV(%) (n=25)
PYR	2	85.7±5.2	6.1	81.5±5.6	6.9
		79.6±4.8	6.0		
		80.7±3.7	5.8		
		78.4±5.6	4.6		
		83.2±7.4	8.9		
	4	94.3±4.7	5.0	93.7±5.9	6.3
		92.4±6.5	7.0		
		92.6±5.9	6.4		
	8	95.3±5.8	6.1	86.3±5.5	6.4
		93.7±4.8	5.1		
		85.9±3.4	4.0		
		83.4±4.5	5.4		
BaP	2	87.6±4.9	5.6	89.2±5.5	6.2
		84.0±3.5	4.2		
		90.7±7.5	8.3		
		92.6±5.8	6.3		
		90.2±4.5	5.0		
	4	87.3±3.6	4.1	84.9±6.1	7.2
		84.6±4.7	5.6		
		91.4±5.6	6.1		
		82.5±6.2	7.5		
	8	79.6±5.3	6.7	86.2±4.9	5.7
		90.4±7.4	8.2		
83.7±4.2		5.0			
88.5±5.7		6.4			
		88.6±5.4	6.1		
		81.7±4.6	5.6		
		85.3±3.7	4.3		
		86.1±4.3	5.0		
		89.3±5.8	6.5		

虾样品中的添加回收率：PYR 和 BaP 在虾中的添加遵循鱼肉中的添加原则，PYR 在虾中的平均回收率为 84.3%-101.9%，CV 小于 7.8%；BaP 在虾中的平均回收率为 86.3%-94.0%，CV 小于 10.4%(附录 II 表 2)。

蟹样品中的添加回收率：经过测定，PYR 在蟹样品中的回收率为 82.3%-99.4%，CV 小于 11.7%；BaP 在蟹中的回收率为 85.5%-87%，CV 小于 9.5%(见附录 II 表 3)。

3.6 方法对比考核

本试验采用 HPLC-FLD 检测方法进行方法的对比考核。PYR 标准品的色谱图如图 10 所示。根据 HPLC-FLD 法，建立了鱼肉样品中 PYR 残留检测的标准曲线(图 11)。PYR 的回归方程为： $y=44460x+44901$ ， $R^2=0.9996$ ，线性范围为 1-20 ng/mL。

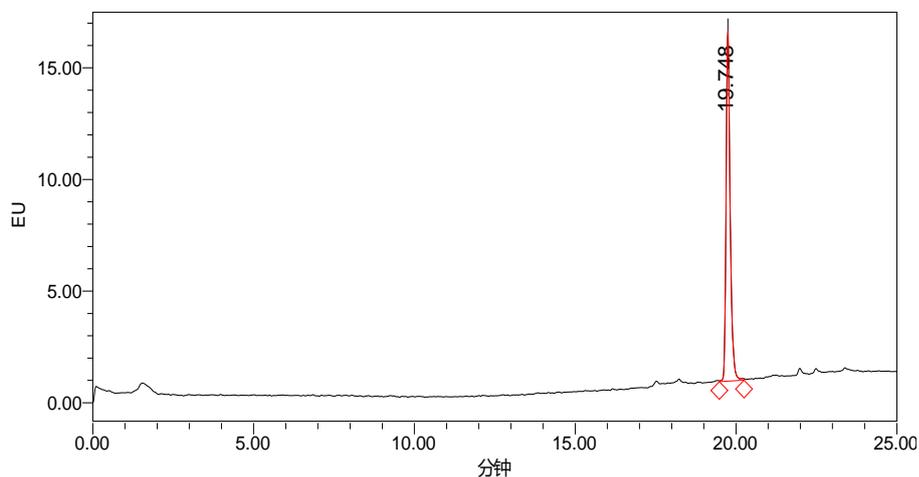


图 10 PYR 标准品的 HPLC-FLD 色谱图(2.0 ng/mL)

Fig.10 HPLC-FLD chromatogram of PYR standard (2.0 ng/mL)

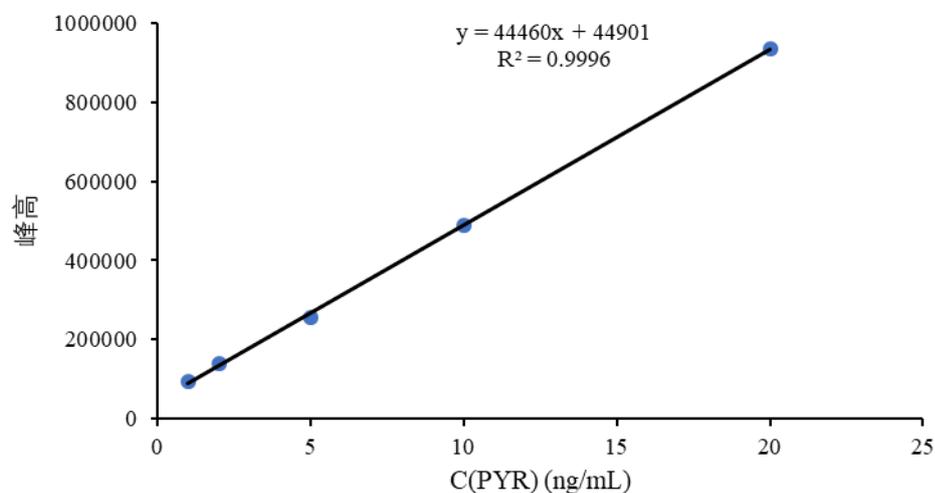


图 11 PYR 的标准曲线(HPLC-FLD)

Fig.11 Standard curve of PYR (HPLC-FLD)

向空白鱼肉样品中添加浓度 1、2、4、8、10 ng/mL 的 PYR 标准品，分别采用 ic-ELISA 和 HPLC-FLD 进行检测。如图 12 所示，ic-ELISA 法和 HPLC-FLD 法的结果较一致， $R^2=0.9961$ 。这说明本研究建立的 ic-ELISA 方法可作为实际样品中 PYR 和 BaP 残留检测的可靠工具。

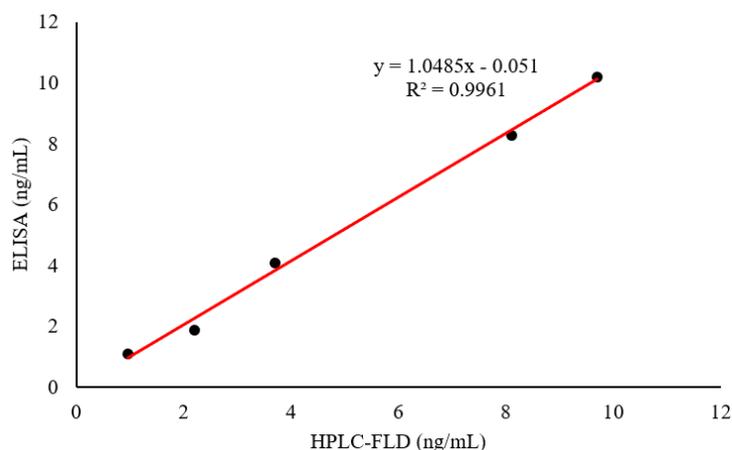


图 12 两种方法的对比(鱼肉)

Fig.12 Comparison of the two methods

3.7 稳定性考察

3.7.1 PBA-OVA 包被原 37℃加速稳定性研究

将 PBA-OVA 包被原包被酶标板并真空包装, 在 37℃ 条件下加速 8 d, 并在加速第 2、4、6、8 d 进行 ic-ELISA 试验, 计算其 IC₅₀ 值。当加速 8 d 时, 其 IC₅₀ 值和“0”孔 OD₄₅₀ 值仍在 100±20% 范围内(图 13), 说明 PBA-OVA 包被原的稳定性较好。在 4℃ 条件下, PBA-OVA 可保存 12 个月。

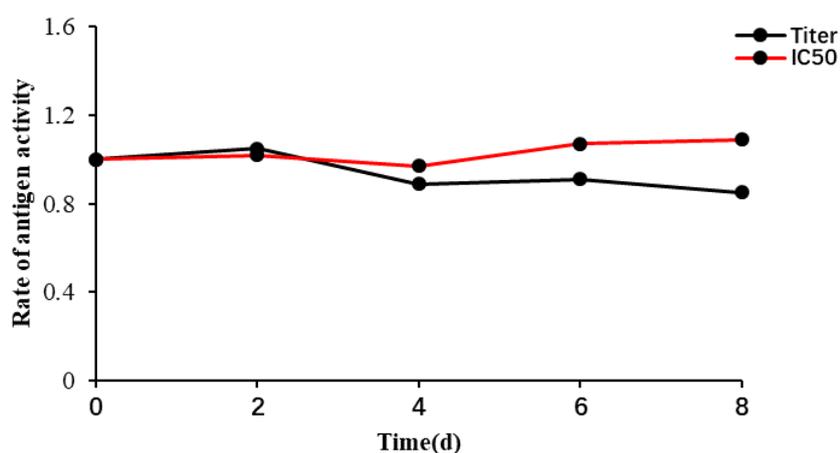


图 13 PBA-OVA 包被原 37℃加速稳定性

Fig.13 The accelerated stability of antigen PBA-OVA at 37°C

3.7.2 抗体工作液 37℃加速稳定性

同样将 4D6 抗体配成工作浓度, 将其置于 37℃ 烘箱进行加速试验。如图 14 所示, 4D6 抗体的 IC₅₀ 值变化不大(100±20%), 但其“0”孔的 OD₄₅₀ 与新鲜组相比,

在 0 d-6 d 维持在 80%左右，第 8 d 在 60%以上。这说明 4D6 抗体在 37℃能放置 6 d 以上，相当于 4℃放置 9 个月。

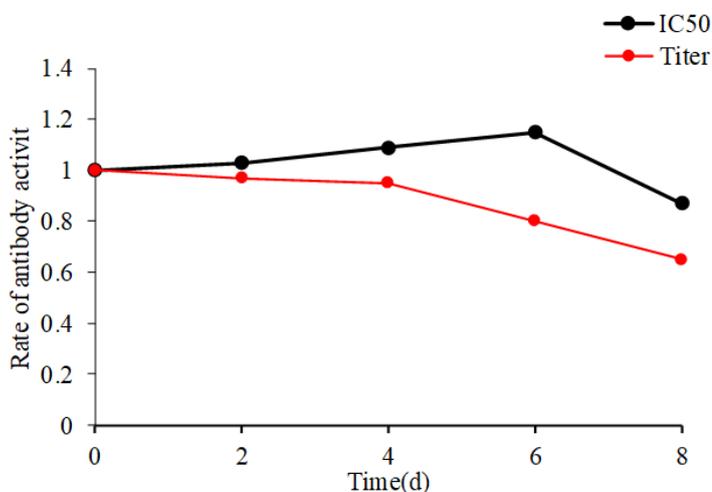


图 14 4D6 抗体 37℃稳定性

Fig.14 The stability of 4D6 mAb at 37°C

3.7.3 PYR 标准溶液 4℃长期稳定性

PYR 标准品用 DMF 配成 1 mg/mL 的母液，每隔 2 个月配一次并置于 4℃冰箱储存，然后进行 ic-ELISA 试验。图 15 可以看出，其 IC₅₀ 值变化不大，在 4℃条件下，PYR 溶液能放置 12 个月，稳定性较好。

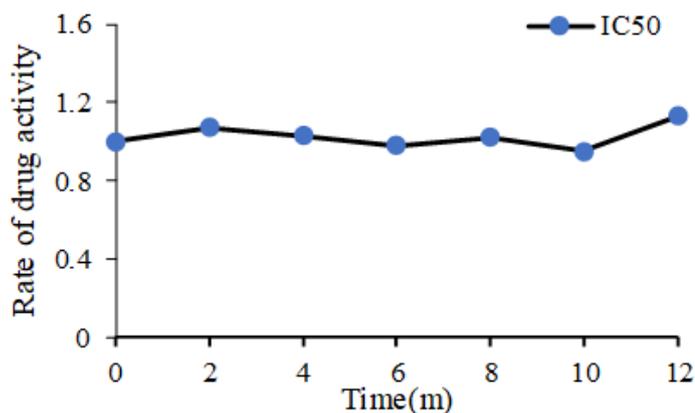


图 15 PYR 标准溶液 4℃稳定性

Fig.15 The stability of standard solution PYR at 4°C

4 讨论

4.1 半抗原的选择

PAHs 没有免疫原性，若要使动物机体产生免疫反应，必须将半抗原与蛋白偶联以人工完全抗原的形式免疫小鼠。半抗原结构对抗体制备至关重要。当半抗原与蛋

白偶联时,半抗原部分是化合物决定簇所在位置,这是免疫原的“核心”,载体蛋白是促进小分子化合物展示其免疫原性的平台(翟长友 2013)。因此,半抗原的选择非常关键(Yu et al 2020)。如果要制备特异性单克隆抗体,一般选择与目标检测化合物差别最小的物质作为半抗原,这样制备的单克隆抗体对目标化合物的识别能力最强;如果为了制备多残留检测的单克隆抗体,应该选择与所有待测物共有部分最相似的半抗原,半抗原的选择应与目标相辅相成。本研究的目的是制备能同时识别 PYR 和 BaP 的单克隆抗体,从 PYR 和 BaP 的结构可以发现,它们共同的母核结构为四个苯环,所以我们应选择具备该特征的半抗原。再者,半抗原要有一定长度的连接臂和活性基团才能与蛋白偶联合成完全抗原(施海燕和王鸣华 2008)。有文献报导,抗体的性能会受到连接臂长度的影响(孟星宇 2015)。一般认为,4-6 个碳原子的连接臂为最佳选择。连接臂太长,容易发生折叠;连接臂太短,半抗原的结构不易暴露,很难被机体识别(刘毅华 2008, 赵宁毅和张婷 2012)。因此,本研究选择由四个苯环和一个丁酸侧链组成的茈丁酸为半抗原,用于后续的研究。

4.2 完全抗原的制备以及免疫效果的影响

完全抗原的制备是整个试验的基础,也是单克隆抗体制备的重要环节。目前常用的载体蛋白有 OVA、BSA、HSA 及 KLH 等。这些蛋白含有大量游离的氨基且免疫原性较强;再者,它们能溶于有机溶剂并保持其活性(胡泽宇 2016)。从实用性和价格考虑,本试验选择 BSA 和 OVA 作为载体蛋白。

由于载体蛋白存在大量游离氨基,半抗原上的羧基可以与其结合形成肽键,其结合半抗原的个数称为偶联比。有研究报道,免疫效果与偶联比有关(Klaus and Cross 1974)。偶联比较低,免疫原的免疫效果不好;偶联比较高,偶联物的溶解度降低,会造成载体蛋白变性沉淀(郝成玉等 2016)。但对于人工抗原的偶联比并没有绝对的标准,有的研究认为偶联比在 3-45:1 的范围内时,免疫原的免疫效果较好;也有的研究认为 10-20:1 范围内的偶联比效果最佳(周纯 2008)。本研究通过不同的投料比制备了不同偶联比的免疫原(8.1、12.8、18.3)和包被原(9.4、11.7、19.2)。通过对小鼠免疫血清的监测可以看到,在一定范围内,较高偶联比的免疫原免疫的小鼠能产生高效价的抗体(表 6),这可能是由于偶联物中暴露了更多的半抗原,刺激小鼠产生更多的抗体;再者,较高偶联比的包被原也能够显著提高抗体的灵敏度(表 8)。因此,偶联比在一定的范围内是可以改善抗体的性能。

4.3 免疫剂量对免疫效果的影响

免疫效果的好坏十分重要，只有小鼠的免疫效果较好，才有可能获得高灵敏度的单克隆抗体。研究表明，小鼠的免疫效果受免疫剂量的影响(赵兰 2014)。因此，本研究设置了两种免疫剂量(50 μg 和 100 μg)，初步探索了其影响。个体动物对给定免疫原的免疫反应特性可能有很大差异，需要设计不同的方案对大量动物进行免疫，以最终证明这些因素的影响。从上述小鼠血清抗体的监测可以看出，100 μg 的免疫剂量相对于 50 μg ，小鼠血清抗体的效价会更高(表 6)；但 50 μg 免疫剂量的小鼠会得到灵敏度更高的血清抗体(附录 II 表 1)。除此之外，免疫周期、免疫次数、小鼠的种类以及小鼠自身情况等都会对小鼠的免疫效果产生影响。本研究仅做了初步探索，具体的影响仍需要大量的试验进行验证。

4.4 免疫程序的设计

小鼠免疫环节耗时较长，本研究一般在四免之后才能进行后续的细胞实验，这至少需要 2 个月的免疫时间。如果细胞融合试验失败，又没有较好的小鼠进行融合，再重新免疫则会花费更长的时间。为了避免此类情况的发生，我们一般会对小鼠进行分批次免疫。这样就能保证融合试验失败后依然有免疫好的小鼠进行后续试验。为了筛选到对 PYR 和 BaP 较灵敏的细胞株，本研究进行了多次细胞试验，小鼠的分批免疫也是多次失败后总结的经验。这可能会造成一定的浪费，但是为了节省时间和制备更灵敏的单克隆抗体，分批免疫是较为合理的方案。

4.5 杂交瘤细胞的融合和克隆化

细胞融合试验成功的前提是要有免疫效果较好的小鼠。因此，在细胞融合前三天对免疫效果较好的小鼠进行冲击免疫，刺激免疫小鼠的 B 淋巴细胞大量增加和分化，使其成为激活状态，后续才可能筛选出灵敏度较高且能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞。在融合前两周，先将瘤细胞进行活化。复苏 SP2/0 骨髓瘤细胞，传 1-3 代，将细胞悬液接种于雌性 Balb/c 小鼠的皮下，待瘤子长至黄豆大小时，制备瘤细胞。经过小鼠活化过的瘤细胞可以直接用于细胞融合，多余的瘤细胞进行扩大培养，冻存储备。如果 SP2/0 骨髓瘤细胞传代次数较多或者冻存时间较长，需要定期使用 8-氮鸟嘌呤进行筛选，以免其返祖。融合剂聚乙二醇(PEG)包括 PEG 4000 和 PEG 1450 两种，由于 PEG 4000 分子量较大，融合过于剧烈，很容易导致细胞损伤。相比之下，PEG 1450 融合过程较温和(孟星宇 2015)。再者，融合率受时间和温度的影响。

一般融合温度为 37℃，融合时间为 90 s，效果最佳(谷敬丽和房娜 2013)。因此，本研究选择 PEG 1450 作为细胞融合剂，在 37℃水浴，融合 60 s，静置 30 s 的条件下进行细胞融合，取得了较好的结果。

根据多次融合试验的经验，发现融合效果受脾细胞和瘤细胞比值的影响，当二者比值在 5-10:1(脾细胞: SP2/0 细胞)时，融合率较高。在细胞融合后的培养阶段，融合细胞生长速度较慢，为了促进其生长，需要加入一定密度的饲养细胞。饲养细胞的密度要适宜，如果密度较大，则会与融合细胞竞争营养，不利于融合细胞的生长；而密度较小，分泌的营养因子较少，细胞生长缓慢。本研究主要以未免疫的 Balb/c 小鼠脾细胞作为饲养层细胞，对于 8 周龄以上的小鼠，每只小鼠的脾脏能铺 8-10 块 96 孔细胞培养板。

在 37℃中培养时，前三天不要移动细胞板，以免影响融合细胞的生长(安玲玲 2015)。第四天要及时观察细胞的生长状态并更换培养基。先用 i-ELISA 对所有细胞孔进行检测，挑出 OD₄₅₀ 值大于 1.5 的孔，然后再进行 ic-ELISA 检测，挑出阳性孔。首次 ic-ELISA 检测药物浓度不能太低，以免阳性细胞漏筛。再者，在检测前 12 h 进行全换液，这是因为早期培养中未融合的 B 淋巴细胞分泌的一些抗体可能会在融合板杂交瘤的初步筛选中产生误导性的阳性反应。对于 OD₄₅₀ 值大于 2.0 的细胞孔，将其稀释后再用 ic-ELISA 检测抗体的灵敏度。因为 OD₄₅₀ 值过高，显示不出药物的抑制效果。通过稀释既可以保证结果的准确性又可以筛掉弱阳性的细胞株。

由于融合的阳性孔里同时存在阴性细胞，该细胞不分泌抗体。因此，初次亚克隆需要在完全培养基中加 1% HT，抑制阴性细胞的生长。用有限稀释亚克隆时，其计数不准或者移液器的误差，均会导致一块细胞板上有的细胞孔存在多个集落或者有的细胞孔没有细胞株的情况出现(史巧巧 2014)。当进行 3 次亚克隆，检测结果全阳性时，必须再进行 1-2 次亚克隆，直到有较多细胞孔中为单个集落且阳性率为 100% 时，才可将细胞定株。细胞融合及克隆化是非常复杂且耗时的试验，有太多的因素会影响试验结果，所以在每次融合和亚克隆时均要将抑制率较好的细胞株进行留株冻存，以免细胞污染或者阳性丢失时没有细胞株进行后续试验。

本试验在杂交瘤细胞的融合、筛选及克隆化过程中失败多次，耗费了大量的人力物力和时间。失败的案例主要有以下几个方面：①细胞融合不成功，无阳性细胞株出现；②融合成功的细胞难以存活；③细胞污染；④阳性细胞突然在某次亚克隆时对药物的识别能力下降甚至消失。经过对多次失败经验的总结，发现有以下几个

方面需要注意：促融剂 PEG 的分子量、融合时间、融合温度等；骨髓瘤细胞的生长状况、是否返祖以及瘤细胞和脾细胞的比例；血清的质量；细菌、真菌、支原体的污染。杂交瘤细胞的融合、筛选及克隆化试验是一随机的、复杂的、周期较长的操作过程，会有许多因素导致实验失败。具体问题需要控制变量，逐一排除。

4.6 ic-ELISA 方法的优化

对于 ELISA 方法，其灵敏度会受到抗原抗体的浓度和孵育时间以及有机溶剂等因素的影响(Chen et al 2021)。通过优化上述条件，可以提高 ic-ELISA 方法的灵敏度。条件筛选的原则是通过“0”孔的 OD₄₅₀ 值和 IC₅₀ 值进行筛选，当“0”孔的 OD₄₅₀ 值在 2.0 左右且 IC₅₀ 值最低者为最佳条件。

首先，优化 PBA-OVA 包被原和抗体的浓度。由于抗体的成本要高于抗原，在筛选时，以抗体的稀释度最大为前提，对包被原浓度进行筛选。

其次，对孵育时间以及羊抗鼠酶标二抗的浓度进行优化。ELISA 的大部分工作是在孵育阶段进行的，如抗体与抗原结合、底物与酶反应，这些关键步骤的发生都有最佳的条件，比如合适的温度和时间。在孵育时间和温度上过于松懈，可能会导致酶标孔内液体蒸发。这些差异会改变孔中关键反应物的浓度，并影响 ELISA 读数的准确性。在 37℃ 条件下，更易于抗原抗体反应，因此本试验的所有孵育温度均为 37℃。而孵育时间对灵敏度的提高也非常重要，本试验对一抗、二抗的孵育时间进行了优化。由于一抗、二抗的结合时间不会太长，本试验将时间设置在 1 h 内。从结果可以看出，时间较短时，“0”孔的 OD₄₅₀ 值达不到 2.0；但随着时间的增加，“0”孔的 OD₄₅₀ 值大于 2.0 且 IC₅₀ 值明显增加，当一抗和二抗孵育时间分别为 35 min 和 40 min 时，灵敏度较高。这可能是因为随着孵育时间的变化，有效结合的竞争药物也随之改变。除此之外，ELISA 反应中酶标二抗的工作浓度也很重要。当其与底物结合显色起到了信号放大的作用，很少的酶标二抗就能显示出较强的信号，所以其浓度不宜过高。过高的浓度的二抗不仅会造成不必要的浪费，还会对灵敏度产生影响。

最后，对有机溶剂进行优化。免疫测定法通常适用于水相，但 PAHs 是疏水亲脂性物质，几乎不溶于水，通常溶于有机溶剂(Meng et al 2015)。根据报道，有机溶剂除了辅助多环芳烃类化合物溶解之外，分析缓冲液中的有机溶剂也会显著影响免疫分析的参数(如最大吸光度，IC₅₀ 值)。优化这些条件可以减少非特异性相互作用，

从而提高检测的灵敏度(Jiang et al 2013)。在本研究的工作中, 考察了一些水溶性有机溶剂(乙腈、DMF 和 DMSO)对 ELISA 灵敏度的影响。从图 8 可以看出, 在 10%-40% 的范围内, 吸光值随每种有机溶剂体积分数的增加而减小。对于 DMF, 其 OD₄₅₀ 值随着体积分数的增加变化较小, 当其体积分数 20% 时, 灵敏度最高。在有机溶剂中控制抗原-抗体结合的因素是非常复杂的, 具体作用机制还有待研究。

4.7 单克隆抗体的特异性

单克隆抗体的特异性是其自身的反应特性, 交叉反应率越小, 其特异性越强(丁良君等 2011)。本试验采用 ic-ELISA 方法测定了 4D6 抗体与 16 种多环芳烃类化合物的交叉反应, 从结果可以看出本研究制备的抗体主要与 PYR(100%)、BaP(38%) 和荧蒽(8%)有交叉, 但是荧蒽的交叉反应率相对较小, 可以忽略。从交叉反应率结果可以看出, 本研究制备的抗体主要与 4-5 环多环芳烃类化合物有交叉, 这是因为制备 4D6 抗体的抗原决定簇为 4 苯环结构。PYR 和 BaP 具有相同的四环结构, 由半抗原茚丁酸制备的抗体与 PYR 和 BaP 有交叉是不可避免的, 这也证实了我们的假设。从交叉反应率可以看出半抗原结构的重要性, 根据不同的目标, 要充分考虑半抗原的设计。再者, 本研究的目的是获得能同时识别 PYR 和 BaP 的单克隆抗体, 在细胞融合和克隆化的过程中是以 PYR 和 BaP 作为竞争药物进行筛选, 所以单克隆抗体的特异性的结果也在预料之内。

4.8 样品前处理

ELISA 方法的前处理极其重要, 该处理不仅要消除样品的基质干扰, 还要将待测药物最大限度地从样品中提取出来, 这样才保证方法的准确性。

由于水产品中 PAHs 化合物的免疫检测方法尚未报导, 样品的前处理参考了仪器检测方法。王圣开对烤鱼中的 BaP 进行提取时, 用环己烷超声提取, 氮吹后过 SPE 小柱, 氮气吹干加乙腈复溶后进行检测。该检测方法操作繁琐且需要过柱处理, 其回收率并不高(81.0%-87.1%)(王开圣 2021)。何苑雯等人使用甲醇和氢氧化钾在 80℃ 水浴条件下提取, 用环己烷萃取, 最后用 Florisil 固相萃取柱进行净化, 该方法的回收率为 71.1%-98.4%。虽然该方法能达到较高的回收率, 但是前处理步骤较多, 时间较长(何苑雯 2013)。房翠兰等人采用 QuEChERS 方法并结合超声辅助对水产品中的 PAHs 进行提取, 用乙腈定容后仍需要过 C18 小柱才能得到较好的回收率(房翠兰等 2021)。从这些仪器检测方法的前处理方法可以看出, 大部分的方法需要多种有

机试剂和小柱净化, 比较繁杂。对于免疫分析方法来说, 样品前处理方法必须简单快速, 一般不需要过柱处理。因此, 本研究对水产品的前处理方法进行了初步摸索。

ELISA 通常在非目标分析物和抗体之间具有很高的非特异性结合。因此, 它们容易产生基质效应。水产品中的脂肪和蛋白质可能会影响抗体和分析物的结合。为了保证检测方法的精确度和准确度, 去除基质效应十分重要(Song et al 2009)。多环芳烃类化合物是亲脂疏水性物质, 为了提高检测的灵敏度, 应根据其化学性质和溶解度特点, 来探索水产品中 PYR 和 BaP 的前处理方法。

首先, 我们评估了基质效应。将空白样品直接用 PBS 处理(Ni et al 2019), 结果表明, 基质效应非常严重, 甚至存在假阳性, 这可能是水产品中的脂肪或者蛋白质的干扰。因此, 在样品前处理时尝试用有机溶剂去处理, 氮吹后分别用 PBS、20% DMF、50% DMF、100% DMF 溶液复溶, 结果发现用 PBS 和 50% DMF 复溶后“0”孔的 OD₄₅₀ 值均偏低; 100% DMF 复溶时其“0”孔的 OD₄₅₀ 值均偏高; 20% DMF 复溶后“0”孔的 OD₄₅₀ 值接近 2.0。这可能是因为 ELISA 条件的优化中使用 20% DMF 作为药物稀释液有关, 这正好与前面的结果相对应。

通过参考亲脂性药物在水产品中的提取方法, 本研究使用乙腈、乙酸乙酯和乙腈-乙酸乙酯(1:2; v: v)这三种提取溶液来考察水产品中 PYR 和 BaP 的提取效果。通过比较发现, 用乙腈-乙酸乙酯(1:2; v: v)对鱼、虾、蟹样品进行处理时, 鱼、虾、蟹的回收率均大于 80%。用乙酸乙酯对水产品中 PYR 和 BaP 进行提取时, 三种样品的回收率均小于 70%, 对药物的提取不充分。然而用乙腈进行提取时, 不能将药物从水产品中提取出来。因此, 本研究选择乙腈-乙酸乙酯(1:2; v: v)作为鱼、虾、蟹样品的提取溶剂。根据回收率的结果, 比较 PYR 和 BaP 在水产品中的回收率。可以发现虾中 PYR 和 BaP 的回收率分别为 84.3%-101.9%和 86.3%-94.0%, 这均大于鱼(81.5%-93.7%、84.9%-89.2%)和蟹(82.3%-99.4%、85.5%-87.0%)中 PYR 和 BaP 的回收率。这是因为鱼和蟹的脂肪含量相对于虾来说较高, 在样品前处理最后复溶加正己烷去除脂肪这一过程中, 鱼和蟹正己烷层的脂肪含量明显多于虾。PAHs 化合物为亲脂性物质, 他们很容易与脂肪结合, 所以鱼和蟹的回收率相对较低。从结果可以看出, PYR 和 BaP 在水产品中的回收率在 81.5%-101.9%之间, CV 小于 11.7%, 这满足试剂盒评判标准的要求。

4.9 稳定性考察

ELISA 方法的应用也需要考察抗原抗体的稳定性,只有抗原抗体较比稳定才能得到较好的检测结果,才能用于后续试剂盒的研发。因此,本试验对包被原和抗体进行 37℃ 加速试验,来考察它们的稳定性。

从结果可以看到,包被原在 37℃ 加速 8 d,其“0”孔的 OD₄₅₀ 值和 IC₅₀ 值仍在 100±20% 范围内,说明包被原较稳定;4D6 抗体在 37℃ 可以放置 6 d 以上(相当于 4℃ 放置 9 个月),因此抗体应该放置 -20℃ 保存。对于 PYR 标准品的考察,从图 15 可以看出,其 IC₅₀ 值变化不大,说明 PYR 标准品溶液稳定性较好,能在 4℃ 存放 12 个月。这与药物的性质有关,因为 PYR 是四环 PAHs,其性质十分稳定。

4.10 与其他免疫检测方法的对比

本研究与其他多环芳烃类免疫分析的研究相比,有以下几个优势:首先,本研究是首次建立水产品中 PYR 和 BaP 的 ELISA 检测方法。因为近几年开发的多环芳烃 ELISA 检测方法大多集中于环境样品,如水(湖水、自来水、饮用水)和空气(Matschulat et al 2005, Spier et al 2009, Meng et al 2015),在水产品中的研究没有报导。但是,目前水产品中多环芳烃类的污染情况较普遍,我国作为水产养殖大国,对水产品中的多环芳烃类化合物残留进行检测十分必要。其次,本研究虽然没有设计新的半抗原,但通过合成不同偶联比的完全抗原,仍然获得了能同时识别 PYR 和 BaP 且灵敏度较高的单克隆抗体。Scharnweber 等人制备了 BaP 单克隆抗体并建立了气溶胶中 BaP 检测的 ELISA 方法(Scharnweber et al 2001)。该方法半抗原的合成步骤繁琐,投入的 BaP 原料药较多且产率不高。由于 BaP 化合物价格较为昂贵,以 BaP 为对象合成半抗原成本较高。邵辉锋建立了自来水中 BaP 的 ELISA 检测方法(邵辉锋 2014),其对 BaP 的 IC₅₀ 值为 13.74 ng/mL,灵敏度低于本研究。该方法同样是以 BaP 为对象合成半抗原,在半抗原的合成中使用了甲苯,吡啶等危害较大的化学试剂;再者,该反应时间较长,在合成的过程中经常需要加热。而 BaP 为一级致癌物,虽然常温下比较稳定,但加热条件下危害较大,如果没有合格的实验条件,很难控制其在合成过程中对环境和人造成的危害。与市售的美国 REAGEN 公司的 BaP 试剂盒相比,检测限更低,前处理方法更简单。该试剂盒需要专门的清洗柱和有机试剂的提取,回收率才能达到 75%。而本研究无需过柱和多种有机试剂提取,只使用乙腈和乙酸乙酯便可达到较好的提取效果,十分适合大批量样品的现场检测。

5 总结

本研究以芘丁酸为半抗原，根据不同的投料比成功合成了不同偶联比的完全抗原。以不同偶联比免疫原和免疫剂量对小鼠进行免疫，在一定的范围内，偶联比越高，小鼠的血清效价越高；50 μg 免疫剂量获得了灵敏度更高的血清抗体，这为后续小分子抗体的制备起到了一定的参考作用。

以 PBA-BSA-A₃ 为免疫原，PBA-OVA-B₃ 为包被原，经过多次细胞融合和筛选成功制备了灵敏度较高的单克隆抗体。基于此抗体，对影响 ELISA 灵敏度的条件进行优化并建立了 ic-ELISA 方法。以 20% DMF 作为标准品稀释液时，ic-ELISA 方法的灵敏度最高，这说明反应体系中加入有机溶剂确实可以微调 ELISA 方法的灵敏度。

将上述建立的 ELISA 方法应用于鱼、虾、蟹中 PYR 和 BaP 的残留检测，PYR 和 BaP 在鱼、虾、蟹样品中的检测限分别为 0.43-0.54 ng/mL 和 0.92-0.98 ng/mL，板内和板间变异系数均 < 11.7%，回收率为 81.5%-101.9%。通过与 HPLC-FLD 方法的对比考核发现，ic-ELISA 与 HPLC-FLD 的相关性较好，其相关系数为 $R^2=0.9961$ ，这可作为实际样品中 PYR 和 BaP 残留检测的可靠工具。

本研究的创新之处在于选择芘丁酸为半抗原，通过完全抗原合成的优化制备出能同时识别 PYR 和 BaP 且灵敏度较高的单克隆抗体。通过对水产品前处理方法的摸索，首次建立了鱼、虾、蟹中 PYR 和 BaP 残留的 ELISA 检测方法。该方法的灵敏度和回收率均高于美国 REAGEN 公司 BaP 试剂盒。这为水产品中 PAHs 残留检测试剂盒的研制与应用奠定基础；为保证水产品的质量提供保障，具有重要的学术价值和实用意义。

参考文献

1. 安玲玲. 氟苯尼考和甲砒霉素两种单克隆抗体的制备及 ELISA 方法的建立. [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2015
2. 丁良君, 李继昌, 付锐, 李德. SM₂ 单克隆抗体的初步应用研究. 食品工业, 2011, 32(07): 69-71
3. 房翠兰, 王贵敏, 向利, 肖伦, 冉秀芝. 优化 QuEChERS 结合 LC-MS-MS 法测定水产品中 8 种多环芳烃的研究. 食品与发酵科技, 2021, 57(03): 152-156
4. 谷敬丽, 房娜. 促进细胞融合和杂交瘤细胞过快生长的方法. 黑龙江科技信息, 2013(29): 101
5. 郝成玉, 李岩松, 乔斌, 孙宇, 司朝朝, 周玉. 萘烯完全抗原的制备与鉴定. 吉林农业大学学报, 2016, 38(04): 467-472
6. 和庆. 长三角地区池塘养殖水产品重金属和多环芳烃污染评价及其生物有效性研究. [硕士学位论文]. 上海: 上海海洋大学, 2018
7. 何苑雯. 水产品中多环芳烃含量测定方法. 科学之友, 2013(10): 32-33
8. 胡泽宇. 萘单克隆抗体的制备及免疫磁珠-ELISA 方法的建立. [硕士学位论文]. 吉林: 吉林大学, 2016
9. 孔蒙蒙. 1-萘丁酸免疫学快速检测技术研究. [硕士学位论文]. 河南: 河南农业大学, 2019
10. 李阿丹, 王晶, 崔宗岩, 曹彦忠, 刘永明. 固相微萃取-气相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中双甲脒及其代谢产物残留. 燕山大学学报, 2016, 40(03): 236-240
11. 李鑫, 乔琰, 钟国祯. 应用基于单克隆抗体的免疫传感器检测环境中的萘和苯并萘. 环境科学, 2015, 36(11): 4319-4324
12. 刘冰, 霍鲁格. 气相色谱-三重四级杆串联质谱法检测鱼肉中多环芳烃的研究. 现代食品科技, 2013, 29(06): 1395-1399
13. 刘波, 王宇, 戚平, 袁利鹏, 聂叶华, 梁惠如. 食用油中致癌物苯并萘的快速免疫检测胶体金层析试纸条研制. 中国油脂, 2016, 41(07): 68-72
14. 刘聪聪, 王冲, 叶可萍, 李春保, 周光宏. 加工肉制品中多环芳烃的研究现状. 中国食品学报, 2021, 21(02): 367-377
15. 刘毅华. 对硫磷半抗原分子设计研究. [博士学位论文]. 浙江: 浙江大学, 2008

16. 刘玉兰, 张小涛, 赵欢欢. 液相色谱-串联质谱法检测食用油脂中苯并芘. 农业机械, 2012(30): 45-48
17. 鹿文婷, 万洁, 宁霞. 高效液相色谱法测定熏烧烤肉中 16 种多环芳烃. 食品安全导刊, 2019(30): 79-80
18. 孟星宇. 芘和蔡单克隆抗体的制备及免疫检测技术的研究. [博士学位论文]. 吉林: 吉林大学, 2015
19. 农业部文件农医发[2005]17 号. 关于发布“兽药残留 ELISA”试剂(盒)备案审查技术资料要求”和“兽药残留 ELISA”试剂(盒)备案参考评价标准”通知
20. 乔斌. 基于荧光微球和金纳米棒的芘和芴检测方法研究. [博士学位论文]. 吉林: 吉林大学, 2018
21. 秦宁, 何伟, 王雁, 何玘霜, 孔祥臻, 欧阳慧灵, 徐福留. 巢湖水体和水产品中多环芳烃的含量与健康风险. 环境科学学报, 2013, 33(01): 230-239
22. 邵辉锋. 苯并芘人工抗原的合成及其 ELISA 方法的建立. [硕士学位论文]. 江西: 江西师范大学, 2014
23. 施海燕, 王鸣华. 半抗原的间隔臂长度对免疫识别的影响. 农药学学报, 2008(02): 172-177
24. 史巧巧. 苯并芘的免疫学快速检测技术研究. [硕士学位论文]. 河南: 河南工业大学, 2014
25. 孙秀梅, 梅光明, 陈雪昌, 郭远明, 陈朋. 高效液相色谱-荧光检测法测定水产品中 15 种多环芳烃. 南方水产科学, 2012, 8(03): 48-53
26. 孙宇. 多环芳烃-菲基于纳米金和纳米磁性颗粒的免疫学检测技术研究. [硕士学位论文]. 吉林: 吉林大学, 2018
27. 汪红军, 郑金秀, 李嗣新, 梁友光, 池仕运, 周连凤, 熊文. 汉江下游水体和鱼体多环芳烃分布特征及健康风险. 水生态学杂志, 2016, 37(06): 51-58
28. 王静香, 刘祖昕, 赵跃龙, 吴全. 我国水产品供需形势分析与预测. 农业工程, 2020, 10(04): 112-116
29. 王军帅, 钱卓真, 吴萍萍, 吴成业. 水产品中多环芳烃的污染和健康风险评估模型研究进展. 福建水产, 2015, 37(01): 79-88
30. 王男男, 李岩松, 孟星宇, 周玉, 乔斌, 孙宇, 胡盼, 卢士英, 任洪林, 柳增善. 芴完全抗原和多克隆抗体制备与鉴定. 食品科学, 2015, 36(09): 108-112

31. 王圣开. 高效液相色谱法测定烤鱼中的苯并[α]芘. 食品安全导刊, 2021(28): 80-81
32. 杨丽波, 庄惠生, 周纯, 叶其炎. 酶联免疫吸附分析法测定环境水体中的萘. 化工环保, 2009, 29(06): 563-566
33. 尹春芹, 彭明涛, 董玉莲. 高效液相色谱法测定水中 16 种多环芳烃. 供水技术, 1993, 99(1): 83-87
34. 翟长友. 孔雀石绿、结晶紫及其代谢物单克隆抗体制备及 ELISA 检测方法研究. [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2005
35. 詹屋强, 王弘. 小分子物质酶联免疫分析方法的研究进展. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(03): 857-862
36. 张春江. 欧盟委员会修订多环芳烃限量法规对我国的启示. 中国畜牧业, 2011(23): 66-67
37. 张天杰. 荧蒽单克隆抗体的制备及其免疫层析试纸条的研制. [硕士学位论文]. 吉林: 吉林大学, 2016
38. 张赢元, 刘俊梅, 郭立泉, 刘延辉, 姜思旭, 徐淼. 水产品中多环芳烃菲的检测及生物降解的研究. 食品科技, 2021, 46(01): 285-291
39. 章骅, 陈旭艳, 张靓文. 在线净化-液相色谱法快速测定熏烤水产品中的苯并[a]芘. 食品研究与开发, 2020, 41(2): 124-128
40. 赵冰, 任琳, 李家鹏, 陈文华, 赵燕. 传统肉制品中多环芳烃来源和检测方法研究进展. 肉类研究, 2012, 26(06): 50-53
41. 赵兰. 邻苯二甲酸二丁酯和苯乙醇胺 A 单克隆抗体的制备及 ELISA 方法的建立. [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2014
42. 赵宁毅, 张婷. 中药小分子化合物人工抗原的制备及鉴定. 时珍国医国药, 2012, 23(07): 1740-1743
43. 赵妍. 拟除虫菊酯类农药残留快速检测方法的建立. [硕士学位论文]. 上海: 上海交通大学, 2020
44. 周纯. 多环芳烃类环境激素的实时定量免疫 PCR 检测方法研究. [博士学位论文]. 上海: 东华大学, 2008

45. Alegbeleye OO, Opeolu BO, Jackson VA. Polycyclic aromatic hydrocarbons: a critical review of environmental occurrence and bioremediation. *Environ Manage*, 2017, 60(4): 758-783
46. Andrés JR, Azzouz A, Evaristo B. Multiresidue determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils by liquid-liquid extraction-solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Food Control*, 2018, 94(94): 268-275
47. Baklanov A, Hänninen O, Slørdal LH, Kukkonen J, Bjergene N, Fay B. Integrated systems for forecasting urban meteorology, air pollution and population exposure. *Atmospheric Chemistry And Physics*, 2007, 7(3): 855-874
48. Barhoumi B, LeMenach K, Devier MH, Ben Ameer W, Etcheber H, Budzinski H, Cachot J, Driss MR. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments from the Bizerte Lagoon, Tunisia: levels, sources, and toxicological significance. *Environ Monit Assess*, 2014, 186(5): 2653-2669
49. Barron MG. Ecological impacts of the deepwater horizon oil spill: implications for immunotoxicity. *Toxicol Pathol*, 2012, 40(2): 315-320
50. Ben Ameer W, Hanen G, Ben Hassine S, Safouen GE, Megdiche Y, Mhadhbi T, Annabi A, Touil S, Driss MR. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Solea solea* from Bizerte and Ghar El Melh Lagoons (Tunisia) and human health risk assessment. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2021, 56(9): 1030-1040
51. Chizhova T, Hayakawa K, Tishchenko P, Nakase H, Koudryashova Y. Distribution of PAHs in the northwestern part of the Japan Sea. *Deep Sea Res. Part II*, 2013, 86: 19-24
52. David RM, Gooderham NJ. Dose-dependent synergistic and antagonistic mutation responses of binary mixtures of the environmental carcinogen benzo[a]pyrene with food-derived carcinogens. *Arch Toxicol*, 2018, 92(12): 3459-3469
53. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*, 1996, 274(5286): 430-432
54. Diggs DL, Huderson AC, Harris KL, Myers JN, Banks LD, Rekhadevi PV, Niaz MS, Ramesh A. Polycyclic aromatic hydrocarbons and digestive tract cancers: a

- perspective. *Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2011, 29(4): 324-357
55. Edwards SC, Jedrychowski W, Butscher M, Camann D, Kieltyka A, Mroz E, Flak E, Li Z, Wang S, Rauh V, Perera F. Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and children's intelligence at 5 years of age in a prospective cohort study in Poland. *Environ Health Perspect*, 2010, 118(9): 1326-1331
56. Epsilon JM, Gerlach CL. A status report on field-portable immunoassay. *Environ Sci Technol*, 1995, 29(7): 312-317
57. Fan R, Ramage R, Wang D, Zhou J, She J. Determination of ten monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid-liquid extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Talanta*, 2012, 93: 383-391
58. Faraji Ghasemi F, Dobaradaran S, Saeedi R, Nabipour I, Nazmara S, Ranjbar Vakil Abadi D, Arfaenia H, Ramavandi B, Spitz J, Mohammadi MJ, Keshtkar M. Levels and ecological and health risk assessment of PM 2.5-bound heavy metals in the northern part of the Persian Gulf. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2020, 27(5): 5305-5313
59. Gobi KV, Miura N. Highly sensitive and interference-free simultaneous detection of two polycyclic aromatic hydrocarbons at parts-per-trillion level using a surface plasmon resonance immunosensor. *Sensors & Actuators, B: Chemical*, 2004, 103(1): 265-271
60. Herikstad BV, Ovrebø S, Haugen A, Hagen I. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine from coke-oven workers with a radioimmunoassay. *Carcinogenesis*, 1993, 14(2): 307-309
61. Honda M, Qiu X, Koyama J, Uno S, Undap SL, Shimasaki Y, Oshima Y. A novel indicator of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in coastal areas. *Environ Geochem Health*, 2018, 12 (1): 1-11
62. Hussein I, Abdel S, Mona SM, Mansour M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Sci Total Environ*, 2016, 25(1): 107-123
63. Jia C, Batterman S. A critical review of naphthalene sources and exposures relevant to indoor and outdoor air. *Int J Environ Res Public Health*, 2010, 7(7): 2903-2939

64. Jiang WX, Zhang HY, Li XM, Liu XX, Zhang SX, Shi WM, Shen JZ, Wang ZH. Monoclonal antibody production and the development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for screening spiramycin in milk. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(46): 10925-10931
65. Kafouris D, Koukkidou A, Christou E, Hadjigeorgiou M, Yiannopoulos S. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in traditionally smoked meat products and charcoal grilled meat in Cyprus. *Meat Sci*, 2020, 164: 108088
66. Karaca G, Cindoruk SS, Tasdemir Y. Migration of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban treatment sludge to the air during PAH removal applications. *J Air Waste Manag Assoc*, 2014, 64(5): 568-577
67. Karsten AF, Pravda M, Guilbault GG. Immunochemical detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Analytical Letters*, 2002, 35(8): 1269-1300
68. Khaiwal R, Sokhi R, Van GR. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation. *J Hazard Mater*, 2008, 42 (13): 2895-2921
69. Kim KH, Jahan SA, Kabir E, Brown RJ. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ Int*, 2013, 60: 71-80
70. Klaus GG, Cross AM. The influence of epitope density on the immunological properties of hapten-protein conjugates. I. characteristics of the immune response to hapten-coupled albumen with varying epitope density. *Cell Immunol*, 1974, 14 (2): 226-241
71. Langlois PH, Hoyt AT, Lupo PJ, Lawson CC, Waters MA, Desrosiers TA, Shaw GM, Romitti PA, Lammer EJ. Maternal occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of oral cleft-affected pregnancies. *Cleft Palate Craniofac J*, 2013, 50(3): 337-346
72. Li M, Yu H, Cheng YL, Guo YH, Yao WR, Xie YF. Simultaneous and rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by facile and green synthesis of silver nanoparticles as effective SERS substrate. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 200: 110780
73. Lu F, Gunter KK, Cheng QF. Heterocyclic amines and polycyclic aromatic

- hydrocarbons in commercial ready-to-eat meat products on UK market. *Food Control*, 2017, 73: 306-315
74. McNutt MK, Camilli R, Crone TJ, Guthrie GD, Hsieh PA, Ryerson TB, Savas O, Shaffer F. Review of flow rate estimates of the deepwater horizon oil spill. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(50): 20260-20267
75. Meng XY, Li YS, Zhou Y, Zhang YY, Yang L, Qiao B, Wang NN, Hu P, Lu SY, Ren H L, Liu ZS, Zhang JH, Wang XR. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of pyrene and related polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal Biochem*, 2015, 473: 1-6
76. Miki S, Uno S, Ito K, Koyama J, Tanaka H. Distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in Osaka Bay, Japan. *Mar Pollut Bull*, 2014, 85(2): 558-565
77. Naing NN, Yeo KB, Lee HK. A combined microextraction procedure for isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient fine air particulate matter with determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2020, 1612: 460646
78. Ni TT, Peng DP, Wang YX, Pan YH, Xie SY, Chen DM, Wang YL, Tao YF, Yuan ZH. Development of a broad-spectrum monoclonal antibody-based indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the multi-residue detection of avermectins in edible animal tissues and milk. *Food chem*, 2019, 286: 234-240
79. Pensado L, Casais MC, Mejuto MC, Cela R. Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. *J Chromatogr A*, 2005, 1077(2): 103-109
80. Chen YS, Shen W, Wu SM, Zhu YL, Hou R, Li L, Dai MH, Peng DP. Preparation of monoclonal antibody and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of ceftiofur in animal-derived foods. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 206: 114378
81. Plaza-Bolaños P, Frenich AG, Vidal JL. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(41):

6303-6326

82. Ravichandran G, Lakshmanan DK, Raju K, Elangovan A, Nambirajan G, Devanesan AA, Thilagar S. Food advanced glycation end products as potential endocrine disruptors: an emerging threat to contemporary and future generation. *Environ Int*, 2019, 123: 486-500
83. Romero IC, Sutton T, Carr B, Quintana-Rizzo E, Ross SW, Hollander DJ, Torres JJ. Decadal assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in mesopelagic fishes from the gulf of mexico reveals exposure to oil-derived sources. *Environ Sci Technol*, 2018, 52(19): 10985-10996
84. Rose M, Holland J, Dowding A, Petch SR, White S, Fernandes A, Mortimer D. Investigation into the formation of PAHs in foods prepared in the home to determine the effects of frying, grilling, barbecuing, toasting and roasting. *Food Chem Toxicol*, 2015, 78: 1-9
85. Scharnweber T, Fisher M, Suchànek M, Knopp D, Niessner R. Monoclonal antibody to polycyclic aromatic hydrocarbons based on a new benzo[a]pyrene immunogen. *Fresenius J Anal Chem*, 2001, 371(5): 578-585
86. Silva SAD, Torres EAFDS, Almeida AP, Sampaio GR. Polycyclic aromatic hydrocarbons content and fatty acids profile in coconut, safflower, evening primrose and linseed oils. *Food Chem*, 2018, 245: 798-805
87. Snyder SM, Pulster EL, Wetzell DL, Murawski SA. PAH exposure in gulf of Mexico demersal fishes, post-deepwater horizon. *Environ Sci Technol*, 2015, 49(14): 8786-8795
88. Song Y, Ge Y, Zhang Y, Liu B, Lu Y, Dong TT, Wang S. Hapten synthesis and enzyme-linked immunosorbent assay for phosmet residues: assay optimization and investigation of matrix effects from different food samples. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 393(8): 2001-2008
89. Uno S, Koyama J, Kokushi E, Monteclaro H, Santander S, Cheikyula JO, Miki S, Añasco N, Pahila IG, Taberna HSJ, Matsuoka T. Monitoring of PAHs and alkylated PAHs in aquatic organisms after 1 month from the Solar I oil spill off the coast of Guimaras Island, Philippines. *Environ Monit Assess*, 2010, 165(1-4): 501-515

90. Van JM, Gerlach CL. Environmental monitoring and human exposure assessment using immunochemical techniques. *J Microbiol Meth*, 1998, 32(2): 121-131
91. Van Lipzig MM, Vermeulen NP, Gusinu R, Legler J, Frank H, Seidel A, Meerman JH. Formation of estrogenic metabolites of benzo[a]pyrene and chrysene by cytochrome P450 activity and their combined and supra-maximal estrogenic activity. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2005, 19(1): 41-55
92. Verma N, Pink M, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. Review on proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity. *Proteomics*, 2012, 12(11): 1731-1755
93. Yu W, Sang Y, Wang T, Liu W, Wang X. Electrochemical immouosensor based on carboxylated single-walled carbon nanotube-chitosan functional layer for the detection of cephalixin. *Food Sci Nutr*, 2020, 8(2): 1001-1011
94. Yu YX, Chen L, Yang D, Pang YP, Zhang SH, Zhang XY, Yu ZQ, Wu MH, Fu JM. Polycyclic aromatic hydrocarbons in animal-based foods from Shanghai: bioaccessibility and dietary exposure. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2012, 29(9): 1465-1474
95. Zhang HY, Wang L, Zhang Y, Fang GZ, Zheng WJ, Wang S. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for seven sulfonamide residues and investigation of matrix effects from different food samples. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(6): 2079-2084
96. Zhang LL, Yang L, Zhou QY, Zhang X, Xing WL, Wei YJ, Hu M, Zhao LX, Toriba A, Hayakawa K, Tang N. Size distribution of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons in fresh combustion smoke and ambient air: a review. *J Environ Sci (China)*, 2020, 88: 370-834
97. Zhang M, Zhang XL, Qu BF, Zhan JH. Portable kit for high-throughput analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons using surface enhanced raman scattering after dispersive liquid-liquid microextraction. *Talanta*, 2017, 175: 495-500
98. Zhou ZF, Lu JL, Wang JY, Zou YS, Liu T, Zhang YL, Liu GK, Tian ZQ. Trace detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental waters by SERS. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2020, 234: 118250

致谢

时光荏苒，白驹过隙，三年的研究生生涯即将接近尾声，行文至此，思绪万千。这三年，我深深领悟到了“人生中的痛苦都是有意义的”这句话的含义。这三年来，我经历过迷茫与坎坷，最终换来了浴火重生般的成长。凡是过往，皆为序章。回想起这三年的点点滴滴，有太多的人需要感谢。在论文完成之际，向所有帮助过我的人致以最诚挚的敬意和衷心的感谢。

首先，感谢我的导师彭大鹏老师这三年来在课题进展以及写作过程的指导。从论文的选题、开题、实验的开展到毕业论文的撰写，彭老师都给予我精心的指导和帮助。彭老师严谨治学的作风、严格的自律以及诲人不倦的态度深深的影响着我。在此，衷心的感谢彭老师这三年对我的谆谆教导。

同时感谢黄玲利老师、潘源虎老师、王玉莲老师、刘振利老师、谢长清老师、王芳老师等在实验过程中给予的大力支持和帮助。

其次，感谢李龙、张鹤营、梁继翔师兄、候仁、司雨师姐、同级陈玉霜、李华明、殷晓阳、杨鸿飞、肖佳旭师弟、陆彦蓉、杨娅林、覃梁妮师妹以及 19 级硕士班的其他同学在生活和实验中提供的帮助。他们勤奋好学和乐于助人的品质，鞭策着我完成学业，使我在科研的路上充满欢乐和斗志。

最后，我要感谢我的家人、恋人李东，在他们物质和精神上的支持和鼓励下，我才能克服重重困难，安心求学。同时，也感谢坚持不懈的自己，感谢自己这一千多天的坚持和努力，才能顺利完成学业。

三年的研究生生活是我生命中一段重要的旅程。这段旅程即将告一段落，我希望自己在接下来的日子里能不忘初心，砥砺前行。再次衷心感谢所有帮助过我的人。盼诸君前程似锦，愿你我未来可期。

附录

附录 I — 作者简介

个人简介

吴双敏，女，汉族，河南省周口市，生于 1995 年 06 月 06 日。

教育背景：

2015 年 9 月-2019 年 6 月，本科，就读于河南科技学院动物科技学院，获理学学士学位。

2019 年 9 月-2022 年 6 月，硕士，就读于华中农业大学动物科学技术学院动物医学院，兽药残留与食品安全方向。

硕士期间主要从事药物残留检测方法的研究工作。包括半抗原、完全抗原的合成，单克隆抗体的制备，残留检测方法及样品前处理等食品安全试剂盒，仪器检测分析等方向的研究。

发表的文章

兽药小分子与生物识别元件的相互作用研究进展

Chen Y, Shen W, Wu S, et al. Preparation of monoclonal antibody and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of ceftiofur in animal-derived foods. *J Pharm Biomed Anal.* 2021; 206: 114378.

Wu S, Shen W, Chen Y, et al. Rapid Determination of Cephalexin in Animal-Derived Food by an Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Analytical Letters.* 2022; 1-14.

附录 II—原始数据

表 1. 小鼠血清抗体的特异性

Table 1. The specificity of antiserum

不同偶联比免疫原	免疫剂量(μg)	不同偶联比包被原的 B/B ₀ 值								
		PBA-OVA-B ₁			PBA-OVA-B ₂			PBA-OVA-B ₃		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
PBA-BSA-A ₁	50	0.59	0.65	0.59	0.57	0.62	0.55	0.56	0.54	0.47
	100	0.79	0.71	0.64	0.75	0.66	0.58	0.63	0.61	0.55
PBA-BSA-A ₂	50	0.63	0.57	0.53	0.59	0.55	0.47	0.52	0.44	0.41
	100	0.68	0.64	0.61	0.63	0.55	0.58	0.59	0.49	0.51
PBA-BSA-A ₃	50	0.41	0.47	0.39	0.38	0.35	0.28	0.34	0.29	0.21
	100	0.52	0.49	0.44	0.47	0.44	0.39	0.42	0.38	0.32

注: 上述 B/B₀ 值均在 100 ng/mL PYR 的浓度下计算。

表 2. PYR 和 BaP 在虾中的添加回收率

Table 2. Recoveries of PYR and BaP in shrimp

化合物	添加浓度 (ng/mL)	回收率(%)	批内 CV (%)	平均回收率(%)	批间 CV (%)
PYR	2	89.6±5.7	6.4	91.1±4.9	5.4
		92.5±7.2	7.8		
		94.4±6.8	7.2		
		88.2±3.5	4.0		
	4	90.6±4.8	5.3	84.3±3.6	4.3
		83.2±2.8	3.4		
		87.6±3.3	4.0		
		82.7±3.8	4.6		
	8	81.5±2.6	3.2	101.9±5.8	5.7
		86.3±4.5	5.2		
		104.3±7.5	7.2		
		100.6±6.3	6.3		
BaP	2	98.7±4.3	4.4		
		97.5±3.7	3.8		
		108.2±5.7	5.3		
		86.5±4.9	5.7		
		89.3±6.4	7.2		

		85.7±6.8	7.9	86.3±6.1	7.1
		84.5±3.2	3.8		
		85.5±4.2	4.9		
	4	94.2±5.4	4.7		
		93.4±4.5	6.9		
		96.5±4.9	4.8	94.0±6.5	6.9
		90.7±8.6	3.5		
		95.3±7.2	4.4		
	8	90.4±10.3	5.5		
		89.7±9.6	10.4		
		92.3±8.9	6.3	91.6±8.6	9.4
		92.4±6.5	7.8		
		93.2±4.2	4.4		

表 3. PYR 和 BaP 在蟹中的添加回收率

Table 3. Recoveries of PYR and BaP in crab

化合物	添加浓度 (ng/mL)	回收率(%)	批内 CV (%)	平均回收率(%)	批间 CV (%)
PYR	2	102.6±11.9	11.6	99.4±9.2	9.3
		98.7±7.4	7.5		
		104.3±12.2	11.7		
		96.7±6.8	7.0		
	4	94.9±5.3	5.6	86.3±4.4	5.1
		89.6±4.7	5.2		
		78.2±3.5	4.5		
		86.5±4.2	4.9		
	8	92.7±5.8	6.3	82.3±5.7	6.9
		84.4±4.3	5.1		
		72.9±5.4	7.4		
		82.6±4.3	5.2		
BaP	2	88.7±5.6	5.6	85.5±4.3	5.0
		89.2±7.2	8.2		
		77.9±5.7	7.3		
		85.3±3.5	4.1		
	4	88.6±4.7	5.3		
		79.7±5.3	6.6		

	91.3±4.7	5.1		
	93.6±5.4	5.8	87±5.7	6.6
	82.4±6.7	8.1		
	88.3±3.6	4.1		
8	87.5±4.7	5.4		
	82.6±5.4	6.5		
	81.3±6.5	8.0	85.9±7.5	8.7
	92.4±7.7	8.3		
	85.6±8.1	9.5		

表 4. PYR 标准曲线数据

Table 4. Data of standard curve for PYR

批次	PYR 药物浓度(ng/mL)					
	0	1	2	4	8	16
1	2.016	1.538	1.322	0.963	0.736	0.413
	1.989	1.512	1.315	0.934	0.718	0.401
	2.007	1.515	1.311	1.021	0.713	0.411
	2.009	1.523	1.339	0.935	0.699	0.395
	2.028	1.514	1.315	0.931	0.593	0.294
2	2.059	1.665	1.479	1.05	0.668	0.365
	1.992	1.591	1.416	1.115	0.678	0.383
	2.038	1.583	1.443	1.132	0.695	0.404
	2.042	1.577	1.414	1.087	0.702	0.411
	2.034	1.559	1.412	1.073	0.696	0.402
3	2.016	1.571	1.418	1.136	0.703	0.386
	2.041	1.524	1.331	0.955	0.631	0.305
	1.999	1.514	1.326	0.943	0.621	0.284
	2.024	1.517	1.333	0.942	0.618	0.297
	2.101	1.641	1.427	1.133	0.712	0.409
4	2.021	1.536	1.336	0.935	0.709	0.391
	2.037	1.524	1.339	0.945	0.717	0.388
	2.02	1.515	1.327	1.014	0.711	0.413
	2.033	1.525	1.324	1.027	0.723	0.409
	2.045	1.519	1.339	0.997	0.725	0.402

5	2.055	1.531	1.383	1.102	0.739	0.394
	2.088	1.544	1.416	1.093	0.722	0.411
	2.04	1.515	1.427	0.936	0.721	0.302
	2.139	1.528	1.438	1.152	0.613	0.295
	2.104	1.541	1.417	1.143	0.642	0.319

表 5. PYR 4℃ 储存稳定性

Table 5. PYR bioactivity after be stored at 4℃

时间(m)	PYR 药物浓度(ng/mL)					
	0	1	2	4	8	16
0	2.112	1.822	1.436	1.043	0.625	0.383
	2.132	1.792	1.501	0.998	0.655	0.391
	2.201	1.801	1.531	1.108	0.601	0.411
	2.187	1.791	1.542	1.078	0.711	0.375
	2.103	1.772	1.562	0.987	0.684	0.395
2	2.009	1.685	1.379	0.952	0.668	0.365
	2.087	1.677	1.382	0.932	0.671	0.372
	2.032	1.641	1.421	0.955	0.577	0.385
	2.087	1.681	1.473	0.983	0.683	0.391
	2.067	1.651	1.444	0.984	0.582	0.372
4	1.987	1.585	1.279	0.943	0.668	0.365
	1.973	1.592	1.277	0.974	0.588	0.382
	2.019	1.610	1.311	0.971	0.614	0.387
	2.005	1.588	1.294	0.985	0.591	0.385
	1.972	1.591	1.286	0.987	0.579	0.301
6	2.059	1.535	1.349	0.942	0.568	0.385
	1.993	1.495	1.309	0.922	0.528	0.351
	2.049	1.526	1.337	0.932	0.552	0.363
	1.991	1.479	1.312	0.916	0.531	0.379
	2.015	1.534	1.311	0.912	0.526	0.371
8	2.059	1.565	1.379	0.975	0.568	0.305
	2.031	1.559	1.376	0.984	0.602	0.396
	2.067	1.583	1.382	1.009	0.613	0.303
	2.038	1.575	1.364	1.003	0.611	0.397
	2.021	1.546	1.367	0.987	0.604	0.318
10	2.101	1.711	1.481	1.007	0.615	0.399
	2.089	1.687	1.494	1.005	0.611	0.346
	2.078	1.686	1.484	0.993	0.604	0.398
	1.986	1.635	1.441	0.963	0.598	0.353
	2.069	1.684	1.462	0.975	0.709	0.31
12	2.104	1.741	1.427	1.017	0.702	0.349
	2.072	1.724	1.417	1.011	0.692	0.383

2.039	1.711	1.412	1.104	0.687	0.399
2.053	1.732	1.406	1.006	0.696	0.347
2.044	1.729	1.421	1.107	0.676	0.398

表 6. PBA-OVA 抗原 37℃加速稳定性

Table 6. The accelerated stability of antigen PBA-OVA at 37℃

时间(d)	PYR 药物浓度(ng/mL)					
	0	0.125	0.5	0.2	0.8	3.2
0	2.034	1.549	1.312	0.957	0.636	0.372
	2.104	1.561	1.407	1.113	0.742	0.339
	2.016	1.481	1.364	1.021	0.706	0.403
	2.089	1.545	1.329	0.974	0.628	0.415
	2.121	1.671	1.421	0.983	0.615	0.429
1	2.101	1.632	1.437	1.021	0.623	0.398
	2.099	1.572	1.407	0.993	0.642	0.427
	2.065	1.568	1.401	0.986	0.647	0.412
	2.076	1.559	1.398	0.983	0.633	0.315
	2.061	1.563	1.395	0.987	0.637	0.324
2	1.97	1.804	1.643	1.114	0.659	0.327
	1.931	1.778	1.684	1.107	0.635	0.419
	1.925	1.736	1.651	1.157	0.626	0.327
	1.983	1.745	1.596	1.138	0.668	0.334
	1.941	1.834	1.639	1.127	0.617	0.346
4	1.993	1.465	1.237	0.902	0.528	0.351
	1.982	1.445	1.213	0.906	0.521	0.361
	1.976	1.427	1.207	0.899	0.611	0.347
	1.969	1.428	1.210	0.891	0.613	0.352
	1.984	1.434	1.197	0.901	0.617	0.351
6	1.952	1.483	1.327	0.922	0.621	0.321
	1.978	1.476	1.329	0.931	0.633	0.342
	1.936	1.475	1.333	0.928	0.625	0.367
	1.947	1.481	1.324	0.925	0.612	0.343
	1.958	1.479	1.332	0.936	0.619	0.324
8	1.899	1.539	1.273	0.913	0.509	0.321
	1.909	1.547	1.271	0.907	0.501	0.318
	1.915	1.539	1.264	0.911	0.498	0.327
	1.882	1.534	1.225	0.913	0.491	0.319
	1.907	1.527	1.277	0.915	0.493	0.335

表 7. 4D6 抗体(工作浓度为 1:20000)37℃加速稳定性

Table 7. The accelerated stability of 4D6 antibody (1:20000) at 37℃

时间(d)	PYR 药物浓度(ng/mL)					
	0	0.125	0.5	0.2	0.8	3.2
0	2.089	1.545	1.329	0.974	0.628	0.415
	2.102	1.593	1.401	0.963	0.626	0.313
	2.096	1.576	1.407	0.971	0.623	0.421
	2.101	1.589	1.397	0.981	0.607	0.417
	2.106	1.581	1.405	0.972	0.616	0.411
2	2.103	1.621	1.417	0.953	0.612	0.403
	2.087	1.562	1.412	0.983	0.617	0.417
	2.064	1.553	1.407	0.978	0.606	0.412
	2.053	1.547	1.398	0.971	0.618	0.422
	2.083	1.574	1.421	0.981	0.621	0.401
4	1.995	1.534	1.421	0.972	0.651	0.393
	1.993	1.521	1.448	0.968	0.638	0.407
	1.986	1.547	1.416	0.961	0.621	0.394
	1.989	1.538	1.425	0.958	0.628	0.401
	1.974	1.524	1.422	0.953	0.626	0.395
6	1.801	1.617	1.257	0.832	0.479	0.361
	1.793	1.606	1.269	0.826	0.463	0.342
	1.821	1.623	1.273	0.852	0.487	0.377
	1.787	1.615	1.284	0.817	0.472	0.357
	1.804	1.619	1.262	0.824	0.479	0.371
8	1.494	1.188	0.832	0.621	0.429	0.251
	1.503	1.193	0.839	0.635	0.437	0.342
	1.513	1.197	0.841	0.633	0.441	0.347
	1.497	1.192	0.833	0.627	0.432	0.357
	1.511	1.123	0.828	0.626	0.423	0.344

附录III—标准操作规程

苈和苯并[a]苈残留检测 ELISA 方法标准操作规程 (SOP)

制定人：吴双敏

1 物品准备与试剂配制

所有玻璃仪器应在使用前认真清洗，过程为：洗涤剂 1 次，自来水冲洗 10 次；中强酸液浸泡过夜，自来水冲洗 15 次，一蒸水冲洗 5 次，去离子水润洗 1 次；充分烘干备用。

磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 配制：准确称取 NaCl 8.00 g，Na₂HPO₄·12H₂O 2.90 g，KH₂PO₄ 0.20 g，KCl 0.20 g，少量去离子水溶解，定容至 1000 mL。(注：本文未注明 pH 情况下，所述 PBS，均为 pH 7.4)

碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 配制：准确称取 Na₂CO₃ 1.59 g、NaHCO₃ 2.93 g，少量去离子水溶解，定容至 1000 mL。

洗涤液配制：准确称取 NaCl 8.00 g，KH₂PO₄ 0.20 g，Na₂HPO₄·12H₂O 2.90 g，KCl 0.20 g，少量去离子水溶解，加入 Tween 20 0.50 mL，定容至 1000 mL。

封闭液配制：准确称取卵清蛋白 10.00 g，加入 1000 mL 磷酸盐缓冲液，搅拌均匀直至蛋白完全溶解，现配现用。

15%蔗糖溶液配制：准确称取蔗糖 15 g，少量去离子水溶解，定容至 100 mL。

羊抗鼠酶标抗体工作液：准确吸取 100 μL 羊抗鼠酶标抗体(-20℃保存)于 4.90 mL 二抗稀释液中，得到 1:50 稀释抗体。准确吸取 1:50 稀释抗体 60 μL 于 5.94 mL 二抗稀释液中，即为 1:5000 酶标抗体工作液。

底物混合液：准确吸取底物 B 液 6 mL，加入底物 A 液 60 μL，混匀，现配现用。

说明：以上所用试剂，除特别注明外均为分析纯；去离子水 18.2 兆欧。所有量器均经过校正，称量和量取误差控制在 1% 以内。

2 酶标板的制备

2.1 PBA-OVA 包被原溶液的配制

准确吸取 20 μL PBA-OVA 包被原储备液(1 mg mL⁻¹)，缓慢加入到 9.99 mL 碳酸盐缓冲液中，涡旋混匀 30 s，得到终浓度为 2 μg mL⁻¹ 的 PBA-OVA 包被原溶液。

2.2 包被

准确吸取 100 μL 包被原溶液于酶标板各孔，水平放置于湿盒，4℃ 孵育 12 h。

2.3 洗板

甩出酶标板孔内包被原溶液，拍干。准确吸取 250 μL 洗涤液于酶标板各孔，微量振荡器上振荡 5 s，甩出洗涤液，拍干。重复洗涤 3 次。

2.4 封闭

准确吸取 250 μL 封闭液于酶标板各孔，水平置于湿盒内，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

2.5 洗板

甩出酶标板孔内封闭液，拍干。准确吸取 250 μL 洗涤液于酶标板各孔，微量振荡器上振荡 5 s，甩出洗涤液，拍干。重复洗涤 3 次。

2.6 固定

准确吸取 250 μL 15% 蔗糖溶液于酶标板各孔，水平置于湿盒内，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min，甩出固定液，拍干，置 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 30 min。

2.7 封装

将干燥后的酶标板和干燥剂一起装入铝箔袋，使用真空封装机封装。

注意事项：包被时各板所加的包被液总重量偏差小于 5%；抽检 5% 封装后的酶标板，板内变异系数 < 5%，板间变异系数 < 10%；使用经验证的 PRY 和 BaP 标准溶液与相应抗体反应绘制标准曲线，“0”孔值的范围在 1.6-2.4 之间，标准曲线相关系数 > 0.99。

3 标准溶液的配制

PYR 标准储备液：称取 10 mg 纯度为 98.5% 的 PYR 标准品，加入 9.85 mL DMF 溶解，涡旋 2 min，即为 1 mg mL^{-1} 的母液。

BaP 标准储备液：称取 10 mg 纯度为 99% 的 BaP 标准品，加入 9.9 mL DMF 溶解，涡旋 2 min，即为 1 mg mL^{-1} 的母液。

100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 标准液：准确吸取 100 μL 母液于 900 μL DMF 溶液中。

10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 标准液：准确吸取 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 标准液 100 μL 于 900 μL DMF 溶液中。

1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 标准液：准确吸取 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 标准液 100 μL 于 900 μL 20% DMF 溶液中。

准确吸取 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 标准液 16 μL 于 984 μL 20% DMF 中，倍比稀释。依次得到 16、8、4、2、1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 标准液，用于间接竞争 ELISA 绘制标准曲线。

4 抗体工作液的配制

将储存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 的抗体取出一支，此为抗体母液。

1:100: 准确吸取 100 μL 母液溶于 0.9 mL 一抗稀释液。此为抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存液。

1:1000: 准确吸取 100 μL 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存液溶于 0.9 mL 一抗稀释液。

1:10000: 准确吸取 100 μL 抗体溶液(1:1000)溶于 0.9 mL 一抗稀释液。

1:20000: 准确吸取 300 μL 抗体溶液(1:10000)溶于 300 μL 一抗稀释液。

5 样品规格与方法技术参数

5.1 简介

本研究的目标待测物是芘和苯并[a]芘。经研究表明, 多环芳烃类化合物是环境中无处不在的持久性有机污染物之一, 具有显著的生物富集性以及致畸性、致癌性和致突变性等危害, 是目前人类接触最多的污染物。其在水产品中的残留已不容忽视, 欧盟食品科学委员会、美国环保局(USEPA)以及我国将苯并[a]芘等 16 种 PAHs 列为优先控制污染物并制定了水产品中的最高残留限量。

5.2 原理

本方法采用间接竞争 ELISA 原理检测 PYR 和 BaP 的含量。检测时, 先后向酶标板孔内加入标准品溶液(或样品处理液)和抗体工作液, 游离的 PYR 或 BaP 将与固定在酶标板上的包被原竞争抗体结合位点。通过洗涤, 与游离 PYR 或 BaP 结合的抗体将被洗掉, 仅留下与酶标板上包被原相结合的抗体在孔内。加入酶标二抗, 与孔内抗体结合, 孵育并洗涤后, 加入底物进行显色。显色后加入终止液终止反应, 此时孔内液体的颜色由蓝色变为黄色, 用酶标仪(波长 450 nm)进行读数。吸光度值与药物浓度成负相关。

5.3 方法技术参数

ELISA 方法灵敏度

LOD(PYR)=0.475 $\mu\text{g L}^{-1}$

交叉反应率

PYR 100%, BaP 38%, FLA 8%。

精密度

本研究 ELISA 检测方法的板内板间变异系数均<12%。

方法重复所需的关键材料

酶标板 1 \times 96 孔/板 10 块

PYR/BaP 标准溶液 16、8、4、2、1、0 $\mu\text{g L}^{-1}$ 各 1 瓶 (500 μL /瓶)

4D6 抗体工作液 1 瓶 (5 mL/瓶)

酶标二抗工作液	1 瓶 (10 mL/瓶)
底物液 A	1 瓶 (100 μ L/瓶)
底物液 B	1 瓶 (10 mL/瓶)
终止液	1 瓶 (5 mL/瓶)

5.4 检测需要但方法不提供的仪器与器材

仪器：酶标仪(配有 450 nm 滤光片)、恒温箱(37 $^{\circ}$ C)、涡旋仪、微量振荡器、电子天平

器材：容量瓶(100 mL、1000 mL)、聚苯乙烯离心管(10 mL、50 mL)、微量单道移液器(3-30 μ L、30-300 μ L、100-1000 μ L)、多道微量移液器(50-300 μ L)、其他玻璃仪器

5.5 测定程序

1. 样品处理

鱼、虾、蟹：取 3 ± 0.05 g 的匀浆物置于离心管中，加入 6 mL 乙酸乙酯，充分震荡 10 min，在 4 $^{\circ}$ C 条件下，8000 r/min 的速度离心 10 min；将上述溶液全部移取，40 $^{\circ}$ C 加热下氮气吹至近干，然后用 1 mL 正己烷溶解干燥的残留物，再加入 1 mL 20% DMF 复溶液强烈震荡 1 min，室温 4000 r/min，离心 5min，除去上层液，取下层液进行 ic-ELISA 检测。

2. 取出试剂盒，平衡至室温，将所需数量的酶标条插入微孔架；

3. 加标准液或步骤 1 所得样品液 50 μ L 到酶标板各孔；

4. 加抗体工作液 50 μ L 至各孔，微量振荡器上振荡 5 s 混匀，水平置湿盒内，37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min。

5. 甩净孔中液体，在吸水纸上拍干。准确吸取 250 μ L 洗涤液于酶标板各孔，微量振荡器上振荡 5 s 混匀，甩出洗涤液，拍干。重复洗涤 3 次。

6. 加入酶标二抗工作液 100 μ L 至各孔，微量振荡器上振荡 5 s 混匀，水平置湿盒内，37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min。

7. 甩净孔中液体，在吸水纸上拍干。准确吸取 250 μ L 洗涤液于酶标板各孔，微量振荡器上振荡 5 s 混匀，甩出洗涤液，拍干。重复洗涤 3 次。

8. 取适量体积的底物 A 液与 B 液按 1:100 的比例混合，现配现用。每孔加入 100 μ L 现配的底物液，微量振荡器上振荡 5 s 混匀，水平置湿盒内，37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。

9. 每孔加入 50 μ L 终止液，15 min 内在酶标仪(450 nm)读取吸光度值。

5.6 结果判定

标准曲线:

以所测定的标准品 OD_{450} 值除以"0"孔 OD_{450} 值(B/B_0)为纵坐标, 标准溶液的浓度的 1000 倍的对数值为横坐标作标准曲线, 并进行线性回归, 给出回归方程, 并计算 ELISA 方法的半数抑制率(IC_{50})。

计算样品的抑制率(所得样品的 OD_{450} 值除以"0"孔 OD_{450} 值), 代入标准曲线的回归方程, 计算出样品中 PYR/BaP 浓度。

5.7 注意事项

1. 使用之前将所有试剂和酶标板平衡至室温。
2. 切勿使用保存有效期外的试剂盒, 不能交换使用不同批号的盒中试剂。
3. 加样过程控制在 15 min 以内, 并要保持完全相同的加样方式。
4. 测定过程不能使酶标孔干燥, 洗板拍干后应立即进行下一步操作, 所加试剂用前需混匀。
5. 底物液对光照敏感, 在配制和显色的过程中应该避光。底物液应为无色澄清的溶液, 若加样前出现变色应弃用。
6. 测定时, 若"0"孔吸光度值 <0.7 , 则提示试剂可能变质失效。
7. 终止液为硫酸溶液, 应避免接触皮肤及衣物。
8. 检测完毕, 所有试剂应立即密封并置于 2-8℃ 保存, 勿冷冻。
9. 反复使用的试剂每次用完后应尽快盖上盖子, 减少试剂进入污染或发生变性的可能。
10. 所有有机试剂均有一定的毒性, 为保证操作人员的安全, 请尽可能在通风橱内操作。

6 安全注意事项

本方法用到的若干种有机试剂以及标准品可能对操作者的健康带来潜在的危害, 请保持实验环境良好的通风。本方法所用标准品应妥善保管, 使用时应特别小心; 实验人员应将各种废液收集, 统一进行处理, 保护环境。个人的防护措施包括穿实验工作服及带一次性口罩和手套。一般性安全设备如灭火器、洗眼喷头、急救箱等必须保持良好状态, 而且易于取到。

附录 IV—答辩委员提出的相关问题和作者回答

王战辉教授:

1. 本研究为什么要做水产品中茈和苯并茈残留检测方法, 之前的研究存在什么问题?

答: 本研究之所以做水产品中茈和苯并茈的免疫检测方法是因为多环芳烃类化合物在国内外的水产品中残留均较严重, 目前所报道的多环芳烃类化合物的免疫检测方法主要集中在大气、水体或者食用油中, 在水产品中的检测较少。目前市售的试剂盒灵敏度较差, 样品前处理较复杂。因此本研究要建立茈和苯并茈的免疫检测方法, 为茈和苯并茈残留检测试剂盒的研发与应用奠定基础, 为水产品的质量提供保障。

2. LOD 的单位应该是 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 或者 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

答: 我会对论文进行仔细审核和修改, 使用正确的单位。

3. 包被原和免疫原的合成方法一样, 为什么没考虑异源包被?

答: 本研究在试验的过程中也考虑到了异源包被, 使用 1-氨基茈以及 7-氨基苯并茈作为半抗原进行合成, 但是使用二者作为包被原时, 包被效果并不好, 抗体几乎没有识别, 所以在论文中也没有写出来。

王丽平教授

1. 论文撰写问题: 目录较长, 建议压缩。文字表达要清晰如“OD 值”, 要把具体波长写出。化合物的缩写要统一。

答: 后期我会按照老师的要求将论文仔细修改。

2. 附录自我介绍只写已发表的成果就行。

答: 后续我会根据老师的意见将附录拟发表的文字删除。

3. 在亲和力测定时, 对苯并茈的亲和力较差, 是否能达到检测要求。

答: 虽然本研究制备的单克隆抗体对茈的识别能力比苯并茈强, 但是对苯并茈的检测限为 $0.92\text{-}0.98 \mu\text{g}/\text{kg}$, 这仍低于最大残留限量, 所以能达到苯并茈的检测要求。

4. 要对抗原抗体制备的创新部分描述出来。

答: 本研究合成了不同偶联比的完全抗原, 并探索了偶联比对免疫效果的影响, 体现了本研究的创新性。后续会对论文进行修改, 通过与其他研究抗原制备的比

较，突出本研究的创新点。

王旭教授

1. 样品前处理种类选择中选择什么部位进行匀质。

答：在残留限量规定上，欧盟规定鱼肌肉中苯并茈的最大残留限量为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、头足纲和甲壳纲为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、双壳贝类为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，所以本研究选择鱼肌肉进行匀质，对虾和蟹来说，选择去壳的可食用部分进行匀质。

2. 仪器考核为什么只选择鱼肉样本？

答：仪器方法对比考核的目的，是通过比较两种方法检测结果的相关性，进而说明 ELISA 方法检测结果的可靠性。因此，只选择一种样品进行检测即可。

郝海红教授

1. 最大残留限量没有茈只有苯并茈？

答：在水产品中多环芳烃类化合物的残留限量制定上，我国和欧盟仅以苯并茈的残留量作为指标。我国规定水产品中苯并茈的最大残留限量为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。欧盟相对我国较清晰，不同种类水产品残留限量不同。欧盟规定鱼类苯并茈限量标准为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，甲壳纲和头足纲动物为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，双壳贝类为 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2. 对苯并茈的识别能力只有 38%，为什么这么低？

答：因为本研究是选择茈丁酸为半抗原，从茈和苯并茈的结构可以看出，茈丁酸与茈的结构更相似，所以对茈的识别能力大于苯并茈，但是苯并茈已经能满足检测要求。

3. 加速试验只做 8 天，这是规定的吗？

答：不是规定的，按照实验室的传统都是做 8 天加速试验。从抗体的加速结果可以看到，在加速第 6 天就已经降至 60%，所以做 8 天就可以。对包被原来说，加速 8 天还较稳定，可以延长时间。

4. 最大残留限量的单位为 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，文章中 LOD 的单位为 ng/mL ，这有什么差异？

答：LOD 的单位应该为 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，文章中写成了 ng/mL ，后续会进行修改。

周锐教授

1. 附录 1 成果不完整，应该把文章的日期以及期刊写清楚。

答：后续我会根据老师的意见把文章信息补充完全。

2. 附录里拟发表的专利，不能说发表专利，应改为专利申报。

答：后续我们会改成专利申报。

3. 3.5 不能定义为应用，模拟样品不能代替实际样品。

答：后续我会根据要求进行修改，对文字内容进行准确表达。