

多溴联苯免疫 PCR 人工抗原的合成及表征*

陈寒玉^{1, 2} 庄惠生^{1*, *}

(1 东华大学环境科学与工程学院, 上海, 201620 2 平顶山工学院环境工程系, 平顶山, 467001)

摘 要 通过保留多溴联苯苯环和在苯环上引入氨基取代基和羧基取代基, 得到两种多溴联苯半抗原. 然后用重氮化法和活化酯法, 把半抗原分别与牛血清蛋白偶联, 合成了两种人工免疫原, 抗原结合比为 1: 17 和 1: 19. 以此免疫原免疫新西兰大白兔, 双向琼脂扩散方法测定血清效价可达 1: 32—1: 64.

关键词 多溴联苯, 免疫 PCR, 抗原, 合成, 表征.

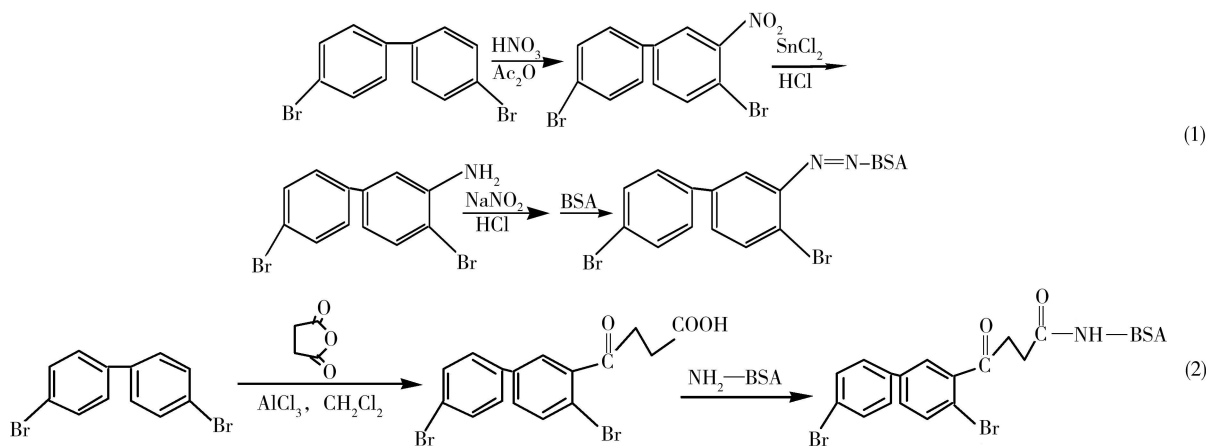
当前, 免疫监测的研究主要关注在直接或间接酶联免疫的检测方法. 但酶联免疫法的检测限和灵敏度低于传统的色谱分析方法. 免疫-PCR 作为一种高灵敏度的免疫监测方法, 近几年在临床医学研究领域得到了快速的发展和深入的研究. 现已成为一种成熟的医学和生物检测方法^[1-5]. 免疫-PCR 和 ELISA 方法相比, 其灵敏度可以提高 100—10000 倍^[1].

本文介绍一种制备多溴联苯人工抗原的合成方法, 合成两种多溴联苯单体的免疫原, 并用于新西兰大白兔的免疫.

1 实验部分

1.1 合成路线

以 4, 4'-二溴联苯为原料, 经过硝化、还原, 与牛血清白蛋白 (BSA) 偶联, 合成两种人工全抗原. 两种多溴联苯抗原的合成路线如下:



两种二溴联苯半抗原的合成路线参见文献 [2].

1.2 3-氨基二溴联苯全抗原的合成

称取 0.1 mmol (0.326 g) 3-氨基二溴联苯, 加入 1 mL 浓 HCl 和 5 mL 水, 加热溶解, 置于冰浴 (4℃ 以下) 中低温搅拌下滴入 4 mL 30% 的 NaNO₂ 水溶液. 继续反应 30 min, 加少量尿素除去未反应的 NaNO₂. 将 0.1 mmol BSA 溶于 40 mL 碳酸盐缓冲溶液 (pH 9.6), 逐滴加入上述重氮盐, 逐渐有橙红色溶液出现, 继续反应 2 h, 得抗原粗品. 将反应液装入透析袋, 置于 0.9% 生理盐水中透析 5 d, 每天换水 2 次, 经紫外可见分光光度计扫描鉴定后, 分装冻存.

2008 年 2 月 24 日收稿.

* 国家自然科学基金 (20677008) 项目资助. * * 通讯联系人, E-mail: hszhuang@dhu.edu.cn

1.3 4-(4,4'-二溴联苯基)-4-氧-丁酸全抗原的合成

称取 0.4 mmol 半抗原, 置于洁净干燥的小锥形瓶中, 加入 400μl N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 使之溶解. 称取 0.4 mmol 二环己基碳二亚胺 (DCC) 与 0.4 mmol N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶于 200—300μl DMF, 在磁力搅拌下逐滴加到小锥形瓶中, 室温搅拌反应 8 h 4℃过夜. 将反应产物以 9000 r·min⁻¹, 离心 15 min 分离. 称取 0.4 mmol BSA 溶于 10ml 0.02mol·l⁻¹ pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中, 逐滴加入 400μl 上清液, 于冰浴条件下反应 4 h. 将溶液装入透析袋, 自来水冲洗 48 h, 0.9% 生理盐水透析 5 d. 离心分出上清液, 即得 PBB—CO—BSA. 偶联物经紫外可见分光光度计扫描鉴定后, 分装于 5ml 离心管中冷冻保存.

1.4 全抗原的表征

将全抗原适当稀释, 使其吸光度在 0.1—2 之间, 以 PBS 为空白对照, 用紫外分光光度计在 220—500nm 分别测定二溴联苯 (PBB₂), BAS 和半抗原-BSA 的吸光值, 绘制紫外吸收光谱图, 并根据以下公式计算偶联比:

偶联结合比 = (C半抗原 M 半抗原) / (C蛋白质 M 蛋白质)

2 结果与讨论

2.1 半抗原衍生物的结构鉴定及理化性质

分别对 3-氨基和 3-丁羧基二溴联苯进行红外光谱 (IR) 分析, 结果如下:
3-硝基二溴联苯 R 谱 (σ/cm⁻¹): 3392 (—NO₂), 1583 (C≡C), 1067 (C—Br), 810 (C—H).
3-氨基二溴联苯 R 谱 (σ/cm⁻¹): 2922 (—NH₂), 1584 (C≡C), 1068 (C—Br), 847 (C—H).
元素分析的计算值 (实测值%): C 44.03(44.60), H 2.752(2.802), N 4.28(4.147).
从还原产物的红外谱图中可以看到, 3-氨基二溴联苯的 R 谱在 2922 cm⁻¹ 和 3031 cm⁻¹ 附近出现了伯胺 N—H 键的不对称伸缩振动和对称伸缩振动 2 个吸收带, 证实硝基已被还原为氨基. 说明还原反应已经完成, 生成了相应的氨基二溴联苯半抗原. 用乙酸乙酯和正己烷 (1:3 V/V) 的混合液作展开剂, 在室温下于硅胶板上展开, 得 3-硝基二溴联苯, R_f= 0.78; 3-氨基二溴联苯, R_f= 0.65
为了验证偶连臂的长短对抗原制备的影响, 本文又采用了傅克酰基化反应的方法, 对二溴联苯进行修饰, 产物 3-丁羧基二溴联苯经过红外光谱和元素分析鉴定. R (σ/cm⁻¹): 3395 (—OH), 2956 2927 (—CH₂), 1709 (C=O), 1589 1375 (VS CO₂⁻), 1134 (C—Br), 883 822 (C—H).
元素分析的计算值 (实测值%): C 46.24(46.60), H 2.716(2.912), N 0 (< 0.030).
从红外图谱分析看出, 在 3395cm⁻¹ 处出现了羧基的羟基峰, 在 2956cm⁻¹ 处有甲基的 C—H 振动吸收峰出现, 1589 cm⁻¹ (S CO₂⁻) 和 1375cm⁻¹ (VS CO₂⁻) 两个峰是羧基的振动特征峰, 从而说明带羧基的碳链已经连接到苯环上. 元素分析结果进一步证明了产物的结构和所设计的路线一致.

2.2 PBBs免疫原的紫外扫描分析

3-氨基二溴联苯全抗原的紫外扫描吸收光谱如图 1 所示. 从 3-氨基二溴联苯 (C)、BSA (B) 及 3-氨基二溴联苯-BSA (D) 的紫外吸收光谱可以看到, 3-氨基二溴联苯在 299nm 波长处有最大吸收峰, BSA 在波长 280nm 处有特征吸收峰, PBB-BSA 最高吸收峰出现前移, 符合 PBB 和 BSA 吸收峰叠加特征. 计算 PBB-BSA 中 PBB 的结合比为 17:1

4-(4,4'-二溴联苯基)-4-氧-丁酸全抗原的紫外扫描吸收光谱如图 2 所示. 从 BSA (B)、4-(4,4'-二溴联苯基)-4-氧-丁酸 (C) 及偶联物 PBB₂—CO—BSA (D) 的紫外扫描吸收光谱图可以看到, 4-(4,4'-二溴联苯基)-4-氧-丁酸在 283 nm 处有最大吸收峰, BSA 在 280nm 处有最大吸收峰, PBB—CO—BSA 的最高吸收峰的出现前移, 符合 PBB 和 BSA 吸收峰叠加特征. 计算 PBB—BSA 中 PBB 的结合比为 19:1

2.3 动物免疫实验验证

选择 2 只成年健康雄性新西兰白兔, 将两种全抗原经过与弗氏完全佐剂充分混合后, 对大白兔进行颈部和背部点状注射免疫, 经过 7 次加强免疫后, 采用试管法和双向琼脂扩散试验考察其抗血清效价, 分别达到 1:320 (1:32) 和 1:640 (1:64), 双向琼脂扩散试验显示交叉反应均不明显. 其双向

琼脂扩散实验结果如图 3所示。

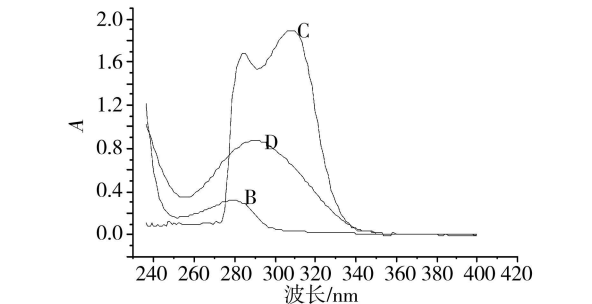


图 1 PBB氨基半抗原、BSA 和 PBB-NH-BSA 的紫外光谱图
B. BSA, C. 3-氨基二溴联苯, D. 3-氨基二溴联苯-BSA

Fig 1 UV spectrum of PBB amino hapten, BSA and PBB-NH-BSA

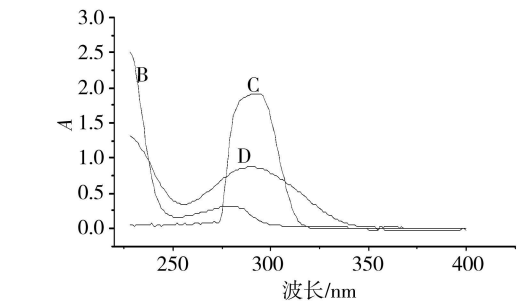


图 2 PBB羧基半抗原、BSA 和 PBB-CO-BSA 的紫外光谱图
B. BSA, C. PBB半抗原, D. PBB-CO-BSA

Fig 2 UV spectrum of PBB carboxyl hapten BSA and PBB-CO-BSA

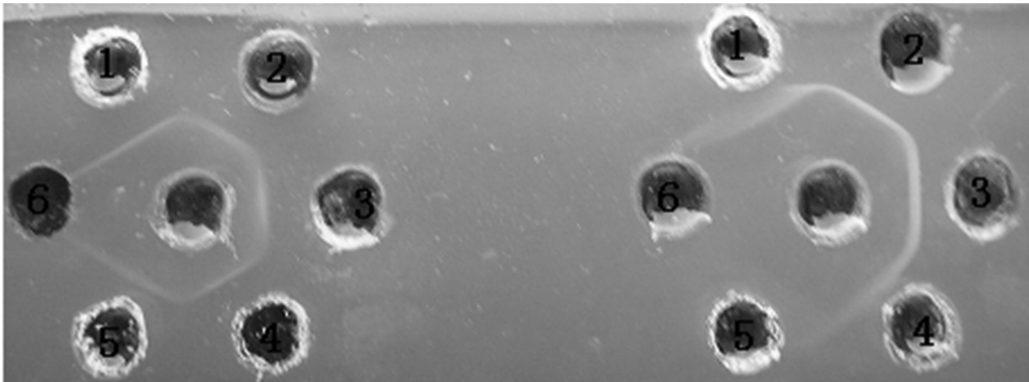


图 3 双向免疫扩散试验示意图

Fig 3 Sketch map of double immunodiffusion test

2.4 荧光免疫 PCR测定抗体的特性

把通过免疫得到的多克隆兔抗体用碳酸盐缓冲溶液 (CBS)稀释后，在 PCR 小管内包被过夜，洗涤后加入生物素化的半抗原和多溴联苯标准稀释液，进行免疫竞争后，洗涤，加入亲和素和生物素化 DNA，孵育洗涤后，加入荧光 PCR 反应混合液，在荧光 PCR 反应仪中进行扩增检测，结果如图 4所示，从扩增曲线的 C_t 值和标准溶液的浓度关系可以看到，二者具有良好的相关性，从而可以进一步证明通过此抗原的有效性。

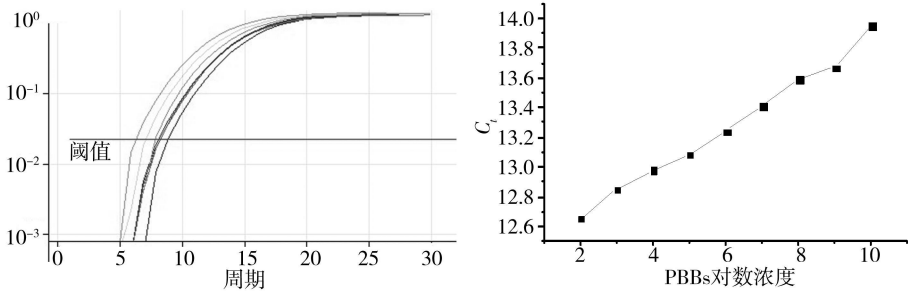


图 4 荧光 PCR 扩增系列多溴联苯标准溶液的扩增曲线和 C_t 值对浓度标准的曲线

Fig 4 Real time PCR amplification of 10-fold serial dilutions of PBBs and C_t via concentration standard curve

由此可见，两种全抗原合成非常成功，而且纯度较高，完全可以为以后的抗体制备和免疫 PCR 分析提供可靠的免疫原。

参 考 文 献

[1] Nimeyer CM, AdlerM, Blöhm D. Fluorimetric Polymerase Chain Reaction (PCR) EnzymeLinked Immunosorbent Assay for Quantification of ImmunoPCR Products in Microplates. *Anal Biochemistry*, 1997, **246** (1) : 140—145

[2] 孙晞, 徐顺清, 聚合酶链式反应 (PCR) 用于检测环境水体指示菌的研究. *环境与职业医学*, 2005, **22** (3) : 202—204

[3] 王中民, 杨国芬, 孔伟, 应用 PCR 检测环境水体中的嗜肺军团菌. *微生物免疫学进展*, 2005, **33** (3) : 45—48

[4] Béla Attila, Sándor Szoboszlai, Zsolt Mikuska. Comparison of Phenotypic and Genotypic Methods for the Detection of Environmental Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2008, **211** (1—2) : 143—155

[5] 陈寒玉, 庄惠生, 多溴联苯的免疫检测研究 I ——半抗原的制备和表征, *化学试剂*, 2008, **30** (3) : 203—205

IMMUNO PCR DETECTION OF PBBs——SYNTHESIS AND IDENTIFICATION OF THE IMMUNOGEN

CHEN Han-yu^{1, 2} ZHANG Huir-sheng¹

(1 College of Environmental Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China
2 Department of Environment Engineering, Pingdingshan Institute of Technology, Pingdingshan 467001, China)

ABSTRACT

In order to establish a new method for the PBBs detection by immuno-PCR, two sorts polybrominated biphenyls hapten was synthesized by introducing amino group and carboxyl group as a substituent at the aromatic ring while retaining the biphenyls ring. The hapten was conjugated to BSA via amino diazotization linkage and by the NHS ester method to get immunogen. The conjugation products was identified by ultraviolet spectrophotometry. The results showed that the molar incorporation ratio reached 1: 17 and 1: 19. New Zealand rabbits were used to injected immunogens to validate the haptens. The antiserum exhibited relatively high antibody titres (1: 32—1: 64) in double agar diffusion.

Keywords polybrominated biphenyls Immuno-PCR (IPCR), immunogen synthesis characterization