

# 己烯雌酚的过氧化氢酶标记及 己烯雌酚免疫传感器

朱将伟<sup>1</sup>, 柴春彦<sup>1</sup>, 刘国艳<sup>1,\*</sup>, 肖红玉<sup>1</sup>, 殷传新<sup>2</sup>, 史贤明<sup>1</sup>

(1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101; 2. 上海精密科学仪器有限公司, 上海 201101)

**摘要:** 本文介绍了过氧化氢酶标记己烯雌酚的合成, 并将合成物用于己烯雌酚免疫传感器的研制, 对传感器的相关条件参数进行了测试, 研制的传感器性能良好, 检测限可达  $8 \mu\text{g/kg}$ 。传感器的成功研制也进一步证明过氧化氢酶标记己烯雌酚的合成获得成功。

**关键词:** 过氧化氢酶; 己烯雌酚; 免疫传感器

Study on Catalase-labelled Diethylstilbestrol Complex and Diethylstilbestrol Immunosensor

ZHU Jiang-wei<sup>1</sup>, CHAI Chun-yan<sup>1</sup>, LIU Guo-yan<sup>1,\*</sup>, XIAO Hong-yu<sup>1</sup>, YIN Chuan-xin<sup>2</sup>, SHI Xian-ming<sup>1</sup>

(1. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China

2. Shanghai Precision and Scientific Instrument Co. Ltd., Shanghai 201101, China)

**Abstract:** The method to synthesize catalase-labelled diethylstilbestrol complex was introduced. The synthesized complex was used to develop the DES immunosensor and the correlative parameters were tested. The sensor performed so well that the detection limit can reach  $8 \mu\text{g/kg}$ , which in turn proves the success in synthesizing the catalase-labelled diethylstilbestrol complex.

**Key words** catalase; diethylstilbestrol (DES); immunosensor

中图分类号: TS207.53

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)05-0057-04

己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)为人工合成的二苯乙烯类雌激素药, 化学名为1, 2-双(4-羟苯基)-1, 2-二

乙基乙烯, 俗名乙底酚。医学上用于治疗雌激素缺乏症, 但是由于其具有促进动物生长的作用, 曾经作为

收稿日期: 2005-04-18

\*通讯作者

基金项目: 上海市农委科技兴农重点攻关资助项目(农科攻字(2002)2第2-5-2)

作者简介: 朱将伟(1980-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品安全。

和其它突变株在液体培养基中发酵达到最高酶活后若继续培养酶活又会迅速下降, 在固体培养基中不会出现此种情况, 可能是因为液体培养环境中, 培养基中的养料大部分已利用, 在没有新的养料补加时, 菌丝在衰亡期出现自溶, 分泌的蛋白酶使漆酶水解。在固体平板上点种, 菌丝不断向前延伸, 在没有生长菌丝的培养基中养料没有利用, 在平板上长满菌丝前, 菌落发黄老化前不出现自溶, 漆酶可在固体培养基中不断积累。我们将深入研究突变株液体发酵的最佳条件并对固、液2种培养方式进行比较研究。

## 参考文献:

- [1] Palonen H, Saloheimo M, Viikari L, et al. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. [J]. *Enzyme and Microb Technol*, 2003, (33): 854-862.
- [2] 上海市农业科学院食用菌研究所. 食用菌栽培技术[M]. 北京: 农业出版社, 1983.
- [3] 吴坤, 闵航, 朱显峰, 等. 杂色云芝产漆酶的分离、纯化和酶学特性研究[J]. *高校化学工程学报*, 2003, 17(2): 173-179.
- [4] 孙剑秋, 周东坡. 微生物原生质体技术[J]. *生物学通报*, 2002, 37(7): 9-11.
- [5] Galhaup C, Haltrich D. Enhance formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 56: 225-232.



促生长剂广泛应用于畜牧养殖业。自从人们发现动物因食用含 DES 的饲料在组织中残留给人类健康带来危害以来,世界上绝大多数国家禁止在食品动物中使用 DES。2002 年我国农业部规定 DES 及其盐、酯制剂禁用于所有食品动物的所有用途。但是,目前滥用己烯雌酚的现象仍然存在,对动物性食品中 DES 残留的检测已引起了国内外的高度重视。因此,有必要研究方便快捷、高效能的己烯雌酚残留检测方法,以进行有效监控。

目前国内外文献报道用于 DES 残留检测的方法很多,主要有气相色谱—质谱联用法(GC-MS)、气相色谱法(GC)、薄层色谱法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)、气液色谱法(GLC)、酶联免疫吸附法(ELISA)、放射免疫法(RIA)等。但这些方法都存在诸如需要昂贵的仪器、样品的前处理繁琐、检测速度慢、不方便现场检测等不足之处。现运用竞争酶免疫反应原理研制适用于现场快速检测的 DES 免疫传感器以期解决此类问题。本文介绍了 DES 传感器的研制方法及一些重要参数的测定,并着重介绍了传感器研制的关键环节——过氧化氢酶标记 DES 的合成。

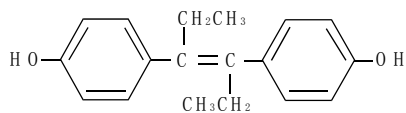


图1 己烯雌酚的结构式  
Fig.1 Structural formula of diethylstilbestrol

## 1 材料与方

### 1.1 实验试剂

己烯雌酚(99%) Sigma, 美国; NaH(55%~65%) Fluka, 瑞士; 4-溴丁酸乙酯(95%, Alfa Aesar); 碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl, ≥98%) Fluka; 过氧化氢酶(CAT) Sigma; 醋酸纤维素(分析纯) 上海化学试剂公司; 己烯雌酚抗体(r-Biopharm) 德国; 过氧化氢水溶液(30%) 上海化学试剂公司; 其它试剂均为 AR 级或 CP 级。

### 1.2 仪器设备

电子分析天平(B1×110S) Sartorius; 加样器 Eppendorf, 德国; 冷冻干燥仪(Alpha 1-2 LD) Christ, 德国; 紫外扫描仪(DU800) BECKMAN COULTER, 美国; 透析袋(DM-20) Membrane; 过氧化氢测定仪 上海交通大学改装。

### 1.3 设计原理

将一定量的过氧化氢酶标记的己烯雌酚加到待测样品中,酶标记的及未标记的己烯雌酚与己烯雌酚抗体膜上的己烯雌酚抗体发生竞争性结合,结合到抗体膜上的酶标己烯雌酚的量将与待测样品中的己烯雌酚含量反相

关,即待测样品中己烯雌酚含量越高则结合到抗体膜上的酶就越少。现将结合到膜上的酶与其底物反应,由于酶的作用将导致膜附近底物浓度的降低,底物浓度的变化又将导致仪器(电极)检测到的电流值发生变化,其电流差值  $I_{\Delta}$  与连接到膜上的酶量正相关,而与样品液中己烯雌酚的含量负相关,以此来间接确定样品中己烯雌酚的含量。

### 1.4 过氧化氢酶标记己烯雌酚的合成<sup>[1,2]</sup>

1.4.1 DES 衍生物的合成(在己烯雌酚的酚羟基上连上一个四碳羧基): a. 将 179mg DES 溶解于 2ml 无水二甲亚砜中→得溶液①, b. 称取 32mg NaH 溶解于 3.3ml 无水二甲亚砜中→得溶液②, c. 将溶液①与溶液②混合,搅拌反应 15min→得溶液③, d. 称取 4-溴丁酸乙酯 133mg, 溶解于 3.3ml 无水二甲亚砜中,溶解完全后加入到溶液③中,在黑暗中搅拌反应 40min,直至反应完全→得溶液④, e. 取水 33ml,逐滴加入 10% 的硫酸,调 pH2,冷却至 0 度后(用塑料烧杯,放入冷冻箱,直至有冰块出现),将溶液④加入到此酸化的冰水中,搅拌 20~30min→得溶液⑤, f. 在溶液⑤中加入冷乙醚 20ml,进行抽提,重复 2 次(保留有机相,抛弃水相),再将乙醚层用水洗涤 2 次, g. 将有机相进行冷冻干燥,得衍生物。

1.4.2 过氧化氢酶连 DES 的合成(利用碳二亚胺法使 DES 衍生物上的羧基与酶蛋白的游离氨基相连): a. 称取 15mg DES 衍生物溶解于 2ml 1,4-二氧六环水溶液(V/V=1:1)→得溶液①, b. 称取 15mg EDC·HCl 溶解于 2ml 1,4-二氧六环水溶液(V/V=1:1)→得溶液②, c. 将溶液①与溶液②混合,再加入 2ml 1,4-二氧六环,轻微搅拌 1min,静置 1h→得溶液③, d. 将溶液③全部倒入到 20ml PBS (0.01mol/L, pH7.2)中→得溶液④, e. 往溶液④中加入 0.3ml 过氧化氢酶溶液(40mg/ml),室温搅拌 1h,4℃静置 20h, f. 4℃透析 72h(PBS, 0.01mol/L, pH7.2, 加少许 1,4-二氧六环)。

### 1.5 传感器的装配

1.5.1 感受器的制备<sup>[3]</sup> 首先制备醋酸纤维素膜,然后在膜上用戊二醛交联上 DES 抗体,并用脱脂奶粉进行封闭。(具体步骤略)

1.5.2 换能器及显示装置的选择 采用整套过氧化氢测定仪(由课题合作单位上海精密科学仪器有限公司协助改装),换能器仍用极谱式电极。

1.5.3 传感器的组装 用橡皮圈把制备好的己烯雌酚抗体膜固定在过氧化氢测定仪的电极表面,有抗体的一面朝外。

### 1.6 标准样品的测定方法

将固定好抗体膜的电极放入过氧化氢水溶液,记录

仪器读数  $I_1$ ，取出电极用蒸馏水冲洗，然后取酶联 DES 溶液 50  $\mu\text{l}$  与 50  $\mu\text{l}$  已知浓度的 DES 标准品溶液(或样品液)混合，滴混合液 50  $\mu\text{l}$  于电极表面的抗体膜上，反应 15 min 后用蒸馏水对电极进行冲洗，用吸水纸吸去残液，然后再将电极放入到同样浓度的过氧化氢水溶液(每次插入电极前均换用新的过氧化氢溶液)，记录读数  $I_2$ 。 $I_1$  与  $I_2$  的差值  $I_\Delta$  即为由于电极附近过氧化氢浓度的减小所导致的电流减小量<sup>[4, 5]</sup>。

### 1.7 传感器试验

按照上述测定方法，以重蒸水代替酶标己烯雌酚对不同浓度的己烯雌酚标准品(0、40、200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )进行测定以判断己烯雌酚对感应电流的影响；选用不同稀释度的酶标 DES (100 倍，1000 倍)用于传感器的试制，以选择合适的酶标 DES 稀释度；试用不同浓度(0.3%，0.03%)的过氧化氢溶液作为底物以确定合适的底物浓度。

### 1.8 标准曲线的制作

分别以 0、2、8、40、200、400、600、800、1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的 DES 标准品按上述方法测定电流变化值  $I_\Delta$ ，以己烯雌酚浓度对电流变化值  $I_\Delta$  作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 过氧化氢酶标记己烯雌酚的分析

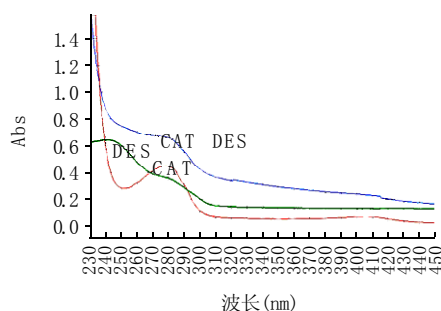


图2 DES 及过氧化氢酶标 DES 扫描图

Fig.2 Scanning beam of diethylstilbestrol and catalase-labelled diethylstilbestrol

图 2 中 CAT-DES 曲线为合成产物进行 100 倍稀释后所得扫描曲线，其中所含酶的浓度约为 0.4  $\text{mg}/\text{ml}$ ；CAT 曲线为过氧化氢酶的扫描曲线，其浓度为 0.4  $\text{mg}/\text{ml}$ ；DES 曲线为己烯雌酚的扫描曲线。

利用公式: 结合比 =  $(\epsilon_{\text{结合物}} - \epsilon_{\text{载体}}) / \epsilon_{\text{半抗原}}$ ，并假设己烯雌酚的摩尔吸光系数与 CAT-DES 中 DES 部分的摩尔吸光系数相当(实际上 CAT-DES 中的 DES 部分是在己烯雌酚的羟基上进行了衍生，其摩尔吸光系数会比己烯雌酚略大)，计算出的结合比约为 20，即每个过氧化氢酶分子上连有 20 个己烯雌酚分子<sup>[6]</sup>。

从扫描图片上可以看出，在 280 nm 处酶蛋白有明显的吸收峰，而在结合物的曲线中 280 nm 处的吸收峰极大减弱并变得不明显，241 nm 处己烯雌酚的吸收峰在结合物中也发生变化，结合物的紫外吸收扫描曲线兼具己烯雌酚和过氧化氢酶的紫外扫描特征，可初步判断两者已结合。

### 2.2 传感器试验结果及分析

#### 2.2.1 己烯雌酚对电流的影响

以重蒸水代替酶标己烯雌酚对不同浓度的己烯雌酚标准品(0、40、200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )进行测定，结果如表 1。从表中数据可以看出其电流变化值很小，从而可以判断己烯雌酚对电流的影响不大，电流变化的主要原因是由于过氧化氢酶对其底物的作用。

表 1 己烯雌酚对电流的影响  
Table 1 Effect of DES on the current

| DES 浓度                      | $I_1$ ( $\mu\text{A}$ ) | $I_2$ ( $\mu\text{A}$ ) | $I_\Delta$ ( $\mu\text{A}$ ) | $I_\Delta/I_1$ (%) |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------|
| 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$   | $1.103 \pm 0.021$       | $1.087 \pm 0.026$       | $0.015 \pm 0.018$            | 1.4                |
| 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$  | $1.111 \pm 0.025$       | $1.055 \pm 0.017$       | $0.058 \pm 0.023$            | 5.2                |
| 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | $1.114 \pm 0.020$       | $1.059 \pm 0.016$       | $0.054 \pm 0.019$            | 4.8                |

#### 2.2.2 酶标己烯雌酚的稀释度

从表 2 中所显示的数据可以看出，当酶标己烯雌酚稀释 1000 倍时，所测得的电流下降的绝对值大大小于稀释 100 倍时， $I_\Delta/I_1$  也明显小于己烯雌酚稀释 100 倍时，故在以后的试验中将采用稀释 100 倍的酶标己烯雌酚。

#### 2.2.3 底物液浓度的选择

从表 3 可以看出，当以 0.03% 的过氧化氢作为底物液时，所测得的电流下降值以及  $I_\Delta/I_1$  小于以 0.3% 的过氧化氢作底物时，其差异显著性亦不及以 0.3% 的过氧化氢作底物，在其后的试验中将以 0.3% 的过氧化氢作为酶的底物。

### 2.3 标准曲线的绘制

表 2 酶标抗原的稀释度对测试电流的影响  
Table 2 Effect of the dilution degree of CAT-DES on the current

| 标准品溶液                       | E - DES 稀释度             |                         |                              |                    |                         |                         |                              |                    |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------|
|                             | 100倍                    |                         |                              |                    | 1000倍                   |                         |                              |                    |
|                             | $I_1$ ( $\mu\text{A}$ ) | $I_2$ ( $\mu\text{A}$ ) | $I_\Delta$ ( $\mu\text{A}$ ) | $I_\Delta/I_1$ (%) | $I_1$ ( $\mu\text{A}$ ) | $I_2$ ( $\mu\text{A}$ ) | $I_\Delta$ ( $\mu\text{A}$ ) | $I_\Delta/I_1$ (%) |
| 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$   | $1.100 \pm 0.027$       | $0.528 \pm 0.021$       | $0.572 \pm 0.013$            | 52.1               | $1.108 \pm 0.023$       | $0.779 \pm 0.015$       | $0.327 \pm 0.012$            | 29.5               |
| 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$  | $1.115 \pm 0.013$       | $0.610 \pm 0.017$       | $0.502 \pm 0.018$            | 45.0               | $1.113 \pm 0.011$       | $0.814 \pm 0.017$       | $0.299 \pm 0.019$            | 26.9               |
| 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | $1.107 \pm 0.025$       | $0.676 \pm 0.019$       | $0.433 \pm 0.022$            | 39.1               | $1.117 \pm 0.013$       | $0.845 \pm 0.013$       | $0.272 \pm 0.021$            | 24.4               |

| 标准品浓度    | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 溶度 |                     |                     |                                    |                     |                     |                     |                                    |
|----------|----------------------------------|---------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------------------------|
|          | 0.03%                            |                     |                     |                                    | 0.3%                |                     |                     |                                    |
|          | I <sub>1</sub> (μA)              | I <sub>2</sub> (μA) | I <sub>Δ</sub> (μA) | I <sub>Δ</sub> /I <sub>1</sub> (%) | I <sub>1</sub> (μA) | I <sub>2</sub> (μA) | I <sub>Δ</sub> (μA) | I <sub>Δ</sub> /I <sub>1</sub> (%) |
| 8μg/kg   | 0.622±0.021                      | 0.322±0.016         | 0.301±0.019         | 48.4                               | 1.100±0.027         | 0.528±0.021         | 0.572±0.013         | 52.1                               |
| 40μg/kg  | 0.627±0.017                      | 0.365±0.014         | 0.262±0.013         | 41.8                               | 1.115±0.013         | 0.610±0.017         | 0.502±0.018         | 45.0                               |
| 200μg/kg | 0.629±0.014                      | 0.402±0.017         | 0.229±0.023         | 36.4                               |                     |                     |                     |                                    |

表4 DES标准溶液的浓度与所对应的电流变化值  
Table 4 The concentration of diethylstilbestrol and the corresponding change of current

| DES浓度 (μg/kg)       | 0           | 2           | 8           | 40          | 200         | 400         | 600         | 800         | 1000        |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| I <sub>Δ</sub> (μA) | 0.601±0.019 | 0.599±0.027 | 0.572±0.013 | 0.502±0.018 | 0.433±0.022 | 0.380±0.011 | 0.331±0.021 | 0.324±0.013 | 0.320±0.017 |

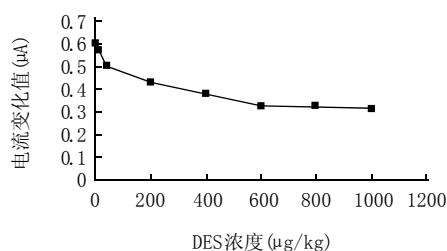


图3 DES标准曲线

Fig.3 Calibration curve of detecting diethylstilbestrol by sensor

图3为以DES浓度对电流变化值作图所得,从图中可以看出当DES浓度为0μg/kg和2μg/kg时其电流变化值几乎相同,在图中的2点显示为重叠,因此认为其传感器的检测限为8μg/kg。从图中也可以看出当DES浓度从600μg/kg提高到1000μg/kg时其电流变化值几乎没有发生变化,而在40μg/kg至600μg/kg时呈现较好的线性关系,这已能满足现场检测的需要。

### 3 讨论

目前,用于检测己烯雌酚残留的方法很多,但都存在前面提到的诸如样品前处理复杂、检测速度慢、需要昂贵的仪器、不能实现现场检测等问题。己烯雌酚免疫传感器的成功研制对于这些问题的解决无疑具有重要意义,它的检测限与ELISA相当,低于国家标准(GB/T 5009.108-2003)的最低检测限(HPLC法,250μg/kg),分析单个样品所耗时间大约为20min,仪器轻便小巧、造价也仅千元左右,但仍然存在不少需要完善的地方,譬

如,电极在使用前需活化30min以上,酶标己烯雌酚在储存过程中酶活性的损失等<sup>[7]</sup>。

本文建立了一种快速检测样品中己烯雌酚含量的方法,利用过氧化氢酶标记的己烯雌酚与过氧化氢测定仪构建的免疫传感器可用于样品中己烯雌酚的定量,亦进一步证明了传感器研制的关键部分——过氧化氢酶标记己烯雌酚的合成获得成功。但研制的传感器也有很多不足之处需要完善。

### 参考文献:

- [1] G Degand, P Schmitz, G Maguin Rogister. Enzyme immunoassay screening procedure for the synthetic anabolic estrogens and androgens diethylstilbestrol, nortestosterone, methyltestosterone and trenbolone in bovine urine[J]. Journal of Chromatography, 1989, 489: 235-243.
- [2] Renzo Bagnati, Maria Grazia Castelli, Luisa Airolidi. Analysis of diethylstilbestrol, dienestrol and hexestrol in biological samples by immunoaffinity extraction and gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography, 1990, 527: 267-278.
- [3] 刘国艳, 柴春彦, 朱建国, 等. 用于检测盐酸克伦特罗残留的免疫传感器感受器部件的研制[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(6): 64.
- [4] Soichi Yabuki, Fumio Mizutani, Yoshiki Hirata. Hydrogen peroxide determination based on a glassy carbon electrode covered with polyanion complex membrane containing peroxidase and mediator[J]. Sensors and Actuators, 2000, 65: 49-51.
- [5] 应太林, 王朝瑾, 孙海鹰. Nafion膜固定的亚甲基蓝为介体的生物传感器[J]. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24(3): 254-257.
- [6] 陈新建, 陈梅英, 赵会杰. 免疫学技术在植物科学中的应用(第一版)[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998. 56-58.
- [7] 沈川, 吕晓东. 己烯雌酚在动物食品中残留检测方法简述[J]. 中国兽药杂志, 2000, 34(6): 47-49.