

利用 EIA 生物测试法快速定量筛选环境样品中的二噁英污染物

黎雯¹, 徐盈¹, 吴文忠¹, K. -W. Schramm², A. Kettrup² (1. 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2. 德国国家环境与健康研究中心生态化学研究所)

摘要: 将采集的环境样品分作 3 份, 1 份用于高分辨色质联用多离子检测测定二噁英的毒性当量浓度 TEQ, 另 2 份分别用 7-乙氧基-异吩噻嗪酮-脱乙酰酶(EROD)活力诱导法和酶免疫法(Enzyme ImmunoAssay, EIA)进行生物测试。结果表明 EIA 和 EROD 这 2 种生物试验方法均具有较好的准确性和很宽的线性范围。比较 Micro-EROD 分析结果与化学分析结果以及 EIA 分析结果与化学分析结果, 发现 Micro-EROD 生物试验所测得的 TEQ 值均高于化学分析法的 TEQ 值。其比值 1.83~3.06, 平均比值 2.54 ± 0.59 。而 EIA 所测得的 TEQ 值与化学结果的比率 0.5~1.4, 平均比率为 0.83 ± 0.40 。显然由 EIA 所测得的 TEQ 的平均值比由 Micro-EROD 所测得的结果更接近化学分析结果。因此 EIA 法更适合于对环境样品中二噁英类化合物进行快速定量筛选。

关键词: 二噁英(PCDD/F); 酶免疫法(EIA); 定量筛选

中图分类号: X83 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2000)04-0069-04

A New Enzyme Immunoassay for TEQ Screening of Dioxin/Furan in Environmental Samples

Li Wen¹, Xu Ying¹, Wu Wenzhong¹, K. -W. Schramm², A. Kettrup² (1. State Key Lab of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. GSF-National Research Center for Environment and Health, Institute of Ecological Chemistry, Germany)

Abstract: The collected environmental sample was divided into three parts, one of which was for TEQ determination by HRGC/HRMS-MID, the other two parts was measured by Enzyme Immunoassay (EIA) and EROD bioassay respectively. The TEQs from EIA and EROD bioassay have a good relationship with those from chemical analysis, suggesting that both EIA and EROD bioassay are reliable for TEQ measurement. When the bioassay TEQs, which derived from EIA and EROD, were compared with results from chemical analysis respectively, the EROD-TEQs (TEQ_{EROD}) are higher than the PCDD/F-TEQs from chemical analysis (TEQ_{PCDD/F}). The ratios between TEQ_{EROD} and TEQ_{PCDD/F} lay between 1.83 to 3.06; the average ratio of TEQ_{EROD}/TEQ_{PCDD/F} is 1.83 ± 0.59 . However, for the EIA assay, the TEQ_{EIA} is around the value from chemical analysis. The ratio between TEQ_{EIA} and TEQ_{PCDD/F} is 0.50 to 1.40; the average ratio of TEQ_{EIA}/TEQ_{PCDD/F} is 0.88 ± 0.40 . It is obvious that the discrepancy between TEQ_{EIA} and the TEQ_{PCDD/F} is smaller than value between TEQ_{EROD} and TEQ_{PCDD/F}. This result reflects that the EIA assay should be more useful for a rapid and sensitive screening of environmental samples in many situations.

Keywords: PCDD/F; enzyme immunoassay(EIA); quantitative screening

多氯代二苯并二噁英 (polychlorinated dibenzo-p-dioxins, PCDD)、多氯代二苯并呋喃 (dibenzofurans, PCDF) 在国际上统称二噁英 dioxin, 是一类环境中广泛存在的有毒有机污染物。二噁英分析是现代分析的难点, 不仅昂贵费时, 而且分析过程冗长。因此, 发展快速、灵

敏、廉价的生物监测方法, 利用计量-效应关系

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29607004); 中科院九五重大(B)项目、国家重点实验室基金和德国大众汽车科学基金会资助。

作者简介: 黎雯(1966~), 女, 湖北洪湖人, 硕士, 副研究员, 主要从事有毒有机污染物的生态毒理学研究。

收稿日期: 1999-09-24

来定量评价二噁英的毒性受到国际上日益广泛的重视^[1-2]。鉴于离体条件下, 大白鼠肝癌细胞株的 EROD 酶活力诱导与二噁英的毒性存在较好的计量-效应关系, 目前, 一种快速、灵敏的离体 Micro-EROD 生物监测法已用于环境样品中二噁英污染物的快速筛选^[3]。

本文将介绍另一种简便、易操作的二噁英生物监测方法——酶免疫分析法(EIA)。该方法是利用老鼠单克隆抗体 DD3 与 PCDD/F 高度结合的特点而建立的竞争抑制酶免疫方法, 因而适合于二噁英污染物毒性等价当量 TEQ 的测定^[4]。研究中对几种环境样品中二噁英化合物进行了定量, 并与离体 EROD 生物监测法和化学分析法所获的结果进行了比较。

1 材料和方法

1.1 样品的采集和提取

环境样品如德国的飘尘、防腐木料、Oder 湖的沉积物和中国鸭尔湖的沉积物经冷冻干燥后研细。称取 1~5g 样品用甲苯索氏抽提 24h。其中用于化学分析的样品于抽提前添加 2, 3, 7, 8-取代的¹³C₁₂标记的 PCDD/F 作为内标。

1.2 样品纯化分离

为除去大量的干扰物质, 样品提取液经浓缩后, 采用多步柱层析法纯化。试剂均为残留分析级。包括:

(1) 活性氧化铝柱, 除去一些极性组分如 PCB 和其他氯代芳烃。

(2) 硫酸酸化硅胶混合柱, 氧化并除去一些芳烃杂质。

(3) 去活弗罗里土(1%)柱, 除去氯代芳烃的干扰。

(4) 小的活性氧化铝柱。

以上所有纯化柱均用无水硫酸钠覆盖。纯化分析步骤详见参考文献[5]。用于化学分析的纯化样品浓缩后在氮气流下, 转入含有 20μl ¹³C₁₂, 1, 2, 3, 4-TCDD 回收标准的小瓶中。用于 EROD 分析的浓缩提取液在氮气流下吹干后溶解在 200μl 4:1 的 DMSO/Isopropanol 中。而用于 EIA 分析的浓缩提取液在氮气流下吹

干后溶解在 200μl 甲醇液中。

1.3 化学法测定 PCDD/F 的毒性当量(TEQ)

在严格的质量控制和保证措施下采用高分辨气相色谱高分辨质谱多离子检测(HRGC/HRMS-MID)定性、定量测定 PCDD/F 的含量, 并按国际上 IUPAC 规定的毒性等价因子 TEF 计算出 17 种有毒 PCDD/F 的 2, 3, 7, 8-TCDD 毒性当量 TEQ 值。采用 HRGC/HRMS 方法, 目的是为了确认生物分析方法的准确性。

1.4 离体 Micro-EROD 生物监测法

(1) 大白鼠肝癌细胞株 H4IIE 的培养 大白鼠肝癌细胞株 H4IIE 由美国国家癌症研究所 E. B. Thompson 教授提供。在无菌条件下, 于 95% 的相对湿度, 5% CO₂, 37℃ 恒温 CO₂ 培养箱中, 将该细胞株生长在 Dulbecco's Minimum 基础培养基上, 该培养基含有 10% 小牛血清, 100μl/ml 盘尼西林和 100μg/ml 链霉素^[6]。

(2) 离体 Micro-EROD 酶活力诱导生物监测 根据 Donato^[7]等人报道的方法原理作了如下改进: 首先将细胞以 1.5×10^4 /孔的密度接种在 96 微孔板中培养。3d 后, 更换新的培养基, 此时将含有试验液或 TCDD 标准的培养基 100μl 加到该微孔板中, 培养介质中的 DMSO 的浓度应少于 0.5%。细胞经暴露 72h 后, 除去介质, 加入 100μl 新鲜的含 8μmol 的 ERF 和 10μmol Dicumarol 于微孔板中, 继续于 37℃ 培养 60min。然后, 将该培养基转移至一个新的 96 微孔板中, 并加入 130μl 乙醇终止反应。于多功能荧光光度计上在 560nm 激发波长和 580nm 发射波长测定终产物 RF 的荧光强度。蛋白测定采用 Smith 法^[8]。

1.5 EIA 生物分析方法

酶免疫分析法在参照前人报道的方法原理基础上^[9], 采用如下测量步骤:

(1) 将老鼠的单克隆抗体 DD3 固化在试管的底部。并将每个试管编上号插入试管架中。

(2) 注入 1.5ml 蒸馏水于试管中, 放置 5min。然后弃去蒸馏水, 再重复操作一遍。

(3) 向每个试管中移入 500μl 蒸馏水并加入 50μl 100mol/L 的 Triton 液。然后加入 10μl

不同浓度的 2, 3, 7, 8-TCDD 标准和样品试验液, 放置过夜, 使 TCDD 标准和样品中的 PCDD/F 与固化在试管的底部单克隆抗体 DD3 充分结合。

(4) 次日, 弃去试管中的溶液, 用蒸馏水 1.0 ml 清洗试管并重复 3 次, 保证试管中只存在固化的单克隆抗体 DD3 和已与抗体结合的 TCDD(或 PCDD/F)。

(5) 向试管中加入 500 μl 的酶竞争配合物 HRP(Horse Radish Peroxidase Enzyme), 混合 10 s, 并放置培养 15 min, 使 HRP 与那些没有被 TCDD(或 PCDD/F) 占据的抗体充分结合。

(6) 重复(4)的清洗过程, 保证试管中只存在与抗体结合的 TCDD(或 PCDD/F)和 HRP。因此, TCDD 的浓度与 HRP 正好成反比。

(7) 移取 500 μl 酶底物, 使之与 HRP 反应产生黄色, 30 min 后加入 500 μl 终止试剂终止反应。产物由黄色变为蓝色。用光度计于 450 nm 波长测定该蓝色产物的强度, 其强度与 TCDD 的浓度正好成反比。

1.6 利用生物分析法测定环境样品中 PCDD/F 的毒性当量(TEQ)的计算

按 Hanberg^[10]法计算生物监测方法的毒性当量(TEQ)。以一组 2, 3, 7, 8-TCDD 浓度 0~320 pg·tube⁻¹ 为标准化合物, 作出 TCDD 的剂量-效应关系标准曲线。样品中化合物的毒性效应以计算出的 TCDD 毒性等价浓度(TEQ)为评价参数。2 次测量的平均偏差为±25%。

2 结果与讨论

为了定量测定环境样品中 PCDD/F 的毒性等价当量浓度 TEQ, 在进行样品测量的同时, 还分别配制了 0, 0.32, 3.2, 10, 32, 100, 320 pg·tube⁻¹ 一系列不同浓度的 2, 3, 7, 8-TCDD 标样, 获得了 EIA 方法测得的不同浓度的 2, 3, 7, 8-TCDD 标样与对应试管的光强度的剂量-效应关系标准曲线(见图 1)。由图 1 可计算出 EIA 测试的检测限 I_{85} 为 3.8 ± 0.6 pg·tube⁻¹ ($n=18$), EIA 测试的半效应剂量 I_{50} 为 $24.5 \pm$

2.2 pg·tube⁻¹ ($n=18$)。可见该方法相当灵敏。在进行样品测量中, 所有样品的浓度均应符合 TCDD 标准曲线的线性范围, 否则就要对样品的浓度加以稀释。样品中化合物的毒性效应以计算出的 TCDD 毒性等价浓度(TEQ)为评价参数。

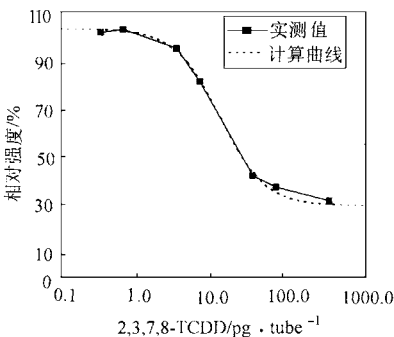


图 1 TCDD 剂量-效应关系标准曲线

Fig. 1 Dose-response relationship for TCDD by EIA

表 1 是利用 EIA 生物免疫试验, 离体 EROD 生物试验和化学分析 3 种方法测定几种环境样品的毒性等价浓度的结果。因为样品的量, 分析方法及样品提取液均是相同的, 因而生物分析法与化学分析法应具有可比性。从表 1 中可见, 利用 EIA 生物试验所测得的 TEQ 值与 EROD 生物试验及用化学分析法测得的 TEQ 值十分一致。本研究选择的几种环境样品中二恶英的浓度变化较大, 从最高浓度的防腐木料, 飘尘到低浓度的沉积物样品, 浓度相差近 3 个数量级, 然而用生物试验法都可以将这些结果很好地反应出来。说明 EIA 和 EROD 这 2 种生物试验方法均具有较好的准确性和很宽的线性范围。

表 2 列出了 EROD 分析结果与化学分析结果的比较以及 EIA 分析结果与化学分析结果的比较。从表 2 可见, 利用 Micro-EROD 生物试验所测得的 TEQ 值均高于化学分析法的 TEQ 值。其比值 1.83~3.06, 平均比值为 2.54 ± 0.59 。而 EIA 所测得的 TEQ 值有的略高于化学结果, 有的略低于化学结果。其比率 0.5~1.4, 平均比率为 0.83 ± 0.40 。显然由 EIA 所测得的 TEQ 的平均值比由 Micro-EROD 所测得

的结果更接近化学分析结果.

表 1 环境样品中二噁英毒性当量(TEQ): EIA 分析结果与 Micro-EROD 和化学分析结果的比较/ $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$

Table 1 TEQs of environmental samples: comparison of EIA assay results with those of micro-EROD assay and chemical analysis

样品 ¹⁾	化学分析 结 果	EROD 分析 结 果	EIA 分析 结 果
飘 尘	11.85×10^3	21.67×10^3	11.65×10^3
防腐木料	21.30×10^3	48.36×10^3	9.70×10^3
沉积物 1	100.2	301.0	64.0
沉积物 2	95.03	291.0	133.0

1) 沉积物 1 取自中国鸭尔湖, 沉积物 2 取自德国 Oder 湖

表 2 EIA 和 EROD 与化学测定方法结果的比较

Table 2 Ratios between biologically derived TEQ (TEQ_{EROD} and TEQ_{EIA}) and PCDD/F-TEQ obtained from chemical analysis ($\text{TEQ}_{\text{PCDD/F}}$)

样品 ¹⁾	$\text{TEQ}_{\text{EROD}}/\text{TEQ}_{\text{PCDD/F}}$	$\text{TEQ}_{\text{EIA}}/\text{TEQ}_{\text{PCDD/F}}$
飘 尘	1.83	0.98
防腐木料	2.27	0.50
沉积物 1	3.01	0.64
沉积物 2	3.06	1.40
平均比率	2.54 ± 0.59	0.88 ± 0.40

1) 同表 1

Micro-EROD 和 EIA 这 2 种生物监测方法与传统的生物监测方法不同, 首先, 它们与二噁英的作用机制有关, 提供的是分子水平上的检测, 因而具有灵敏、快速和专一的特点. 其次, 它们利用计量-效应关系曲线来计算二噁英的浓度, 因而可用于二噁英的定量分析. 从本文的研究结果看, 利用 Micro-EROD 生物试验所测得的 TEQ 值高于化学分析法的 TEQ 值 1.83 ~ 3.06 倍, 说明试验样品提取液中存在 PCDD/F 以外的其他酶诱导物. 为了获得更准确的结果, 样品提取液必须进行进一步更有效的净化. 而 EIA 所测得的 TEQ 值有略高于或略低于化学结果者, 其比率从 0.5 到 1.4. 这说明该方法还不是很稳定, 有待进一步研究改进. 但可以看出 EIA 生物分析法比 EROD 生物分析法对 PCDD/F 更具专一性, 其分析结果更接近化学分析结果. 因 EIA 生物试验法在分析时

间和费用上均优于 EROD 生物试验法, 可见 EIA 法有望成为环境的危险性评价中另一种快速、灵敏的生物分析方法并将广泛用于环境中二噁英类污染物的快速定量筛选.

参考文献:

- 1 Safe S H. Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic response and implications for risk assessment. Crit. Rev. Toxicol., 1994, **24**: 87~ 149.
- 2 Tillitt D E, Ankley G T and Giesy J P. Characterisation of the H4IIE rat hepatoma bioassay as a tool for assessing toxicpotency of plannar halogenated hydrocarbons in environmental samples, Environ. Sci. Technol., 1991, **25** (1): 87~ 92.
- 3 Wu W Z, Schwirzer S M G et al. Rapid bioassay as indicator of potential harmful effects for dioxin-like compounds in sample of Ya-Er lake, China: requiremants for clean-up and comparison to chemical analysis. Fresenius Envir Bull., 1996, **5**: 374~ 379.
- 4 Harrison R O, Carlson R E. An Immunoassay for TEQ screening of Dioxin/Furan samples: current status of assay and application development. Chemosphere., 1997, **34**(5~ 7): 915~ 928.
- 5 Wu W Z, Schramm K. -W, Henkelmann B et al. PCDD/Fs, PCBs, HCHs and HCB in sediments and soil of Ya-er lake area in China: Results on residual levels and correlation to the organic carbon and the particle size. Chemosphere., 1997, **34**(1): 191~ 202.
- 6 Deml E, Wiebel F J, Oesterle D. Biological activity of 2, 4, 8-trichlorodibenzofuran: promotion of rat liver foci and induction of cytochrome P450-dependent monooxygenases. Toxicocol., 1989, **59**: 229~ 238.
- 7 Donato M T, Gomez-Lechon M J, Castlell J V. A microassay for measuring cytochrome P4501A1 and P450 11B1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates. Anal. Biochem., 1993, **213**: 29~ 33.
- 8 Smith P K, Kohn R J et al. Measurement of protein using bicinchoninic Acid. Anal. Biochem., 1985, **150**: 76~ 85.
- 9 Stanker L H, Watkins B, Rogers N, Vanderlaan M. Monoclonal antibodies for dioxin: antibody characterization and assay development. Toxicology, 1987, **45**: 229~ 243.
- 10 Hanberg A, Strahlberg M et al. Swedish Dioxin Survey: Envalution of the H4IIE bioassay for screening environmental samples for dioxin-like enzyme induction. Pharmacology and Toxicology, 1991, **69**: 442~ 449.