

文章编号:1673-1689(2008)06-0082-04

灰霉菌多克隆抗体的制备与鉴定

张银志¹, 孙秀兰^{*1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要:建立了一种新的检测灰霉菌的方法。利用灰霉菌培养基中分离得到的菌丝体上清液抗原和孢外多糖抗原,通过免疫 Balb/c 小鼠后,经离心、沉淀和纯化后得到了灰霉菌抗体。实验结果表明,上清液抗原的免疫效果要好于孢外多糖抗原的免疫效果。纯化后的抗体的效价大于 13 000,最低检测限 1 ng/mL。该研究为今后的 ELISA 法快速检测灰霉菌提供了一些参考依据。

关键词:灰霉菌;多克隆抗体;制备;鉴定

中图分类号:TS 201.6

文献标识码:A

Production, Purification and Characterization of Ployantibody Against *Botrytis Cinerea*

ZHANG Yin-zhi¹, SUN Xiu-lan^{*1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214036, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Purpose: to establish a new way to detect method gray mold. Method: the mycelium supernatant antigen and the exopolysaccharides antigen were obtained from the liquid medium. Through immunizing Balb/C mice and isolation and purification, the botrytis cinerea ployantibody was obtained. The results showed that the mycelium supernatant antigen was better than that of exopolysaccharides antigen. Results: The titers of the antiserum is over 13000, The limit of detection is 1 ng/mL. This study provide a way for the ELISA detection of botrytis cinerea.

Key words: *Botrytis cinerea*; ployantibody; production; characterization

灰霉菌属半知菌亚门葡萄孢属。呈灰黑色,菌核褐色,形状不规则,大小 2~4 mm×1~3 mm^[1]。能够侵染近 200 多种植物^[2],它是引起葡萄采摘后病害的主要病原真菌之一。在葡萄采摘时,无论在

有伤或无伤时接触灰霉菌均会造成果粒软腐、干腐、裂果,还可引起果粒脱落。灰霉菌能够自身分泌和诱导寄主产生果胶酶,具有能够长期潜伏侵染、适于寄主生理状态和降低寄主产生防御反应的

收稿日期:2007-10-15.

基金项目:国家 863 计划项目(2007AA10Z428).

作者简介:张银志(1975-)男,陕西汉中,工程师,主要从事食品安全检测分析与研究.

* 通讯作者:孙秀兰(1976-)女,山东聊城人,副教授,主要从事食品质量与安全方面的研究.

Email: sxlzz@yahoo. com. cn

共生亲和功能,而且具有较强的低温(4℃)条件下的致病性,因此,比其它致病菌的危害性更大。霉菌毒素对人体的免疫系统有着极大的危害,有效的检测手段将会最大程度地保障人类的安全。

传统的灰霉菌的检测方法有琼脂基培养法,平板计数法,光谱检测法,霉菌快速检验纸片法等。1986年Lin和Cousin等人,以西红柿汁中常见的污染菌交链孢霉(*Alternaria alternata*)、白地霉(*Geotrichum candidum*)、匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)为研究对象,以它们的冷冻干燥菌丝为抗原,通过免疫Balb/c小鼠获得特异性抗体,ELISA试验结果的交叉反应率小于10%,样品中最小检出量达到1 μg/g,无背景干扰,ELISA读数和西红柿汁中这些污染真菌的含量具有较好的相关性。Notermans等人(1986,1988)以真菌的胞外多糖为抗原,用ELISA检测分析了坚果、水果、果汁、蔬菜、粮食中曲霉属(*Aspergillus*)、根霉属(*Rhizopus*)、分枝霉属(*Cladosporium*)、毛霉属(*Mucor*)、青霉属(*Penicillium*)等属的真菌,并和常规的霉菌平板菌落计数法相比较,发现ELISA更能准确反映食品中这些真菌的污染程度,而平板计数法则在样品处理过程中对真菌的影响较大,因而不能很准确地反映污染情况。1991年Ricker等人用ELISA方法定量分析了成熟葡萄中灰霉葡萄孢(*Botrytis cinerea*)的污染情况。国内鲜有关于用ELISA方法来检测灰霉菌的报道。本研究中利用灰霉菌的菌丝体上清液作为抗原,经过免疫小鼠成功得到灰霉菌的多克隆抗体^[3-4],为用ELISA方法检测灰霉菌提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 灰霉菌菌种 葡萄灰霉菌由国家农产品保鲜中心(天津)提供。

1.1.2 培养基 PDA培养基配方:土豆100 g,葡萄糖20 g,琼脂20 g,pH值为5.4。将土豆切成丁称取100 g,加入500 mL的水,在电炉上煮沸。经4层纱布过滤取清液于锥形瓶中再加入葡萄糖。由作者所在江南大学实验室自制。

1.1.3 主要化学试剂 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、牛血清蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA):Sigma公司提供(美国)。辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG酶标二抗:杭州艾康生物技术有限公司提供。PBS缓冲液,作者所在实验室自制。透析带(截留相对分子质量14 000):上海华美生物工程有

限公司提供。ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)使用液^[5]。

1.1.4 实验动物 6周龄雌性SPF级Balb/c小鼠,购自复旦大学实验动物中心。

1.2 主要仪器

DS-1高速组织捣拌机:上海标本模型厂生产;5804-R冷冻离心机:PPENDORF产品;WFJ2000型可见分光光度计:尼克上海仪器有限公司生产;酶标仪和洗板机:Labsystem产品(芬兰);冷冻离心机:Allegra产品(美国);冷冻干燥机:Labconco产品(美国);微量可调移液器:Finnpipette产品(芬兰);96孔和16孔酶标板:Corning产品(美国)。

1.3 试验方法

1.3.1 免疫抗原的制备 菌种的活化培养:制备抗体前菌种先经过2次传代,每次32 h。

1.3.2 抗原的收集 上清液抗原的制备^[6]:在培养第12天^[7]量取液体培养基中的培养液,冷冻离心4 000 r/min,5 min,取上层清液作为抗原,放入冰箱冷藏室中保存,备用。

胞外多糖抗原的制备:量取液体培养基中的培养液,冷冻离心4 000 r/min,20 min。取上层清液,加入2倍体积的95%体积分数乙醇^[8],用玻璃棒搅起丝状沉淀物,再冷冻离心4 000 r/min,10 min,去掉上清液,再分别用体积分数85%乙醇洗涤沉淀物两次,沉淀物即为胞外多糖,加入5 mL PBS后即为胞外多糖抗原^[8-9]。放入冰箱冷藏室中保存,备用。

1.3.3 灰霉菌抗血清的制备

1)动物免疫 通过预养一周BALB/c小鼠,将得到的抗原与弗氏佐剂混合免疫注射BALB/c小鼠。通过3次免疫,从BALB/c小鼠取血提取抗体。通过间接ELISA法稀释不同浓度的抗原,抗体检测是否有灰霉菌抗体产生并比较两种抗原的免疫效果。基础免疫共5次,间隔3周,首次基础免疫时,取1 mL灰霉菌免疫抗原加等量的完全福氏佐剂充分乳化。每次抗原用量为50 μg/只,加强免疫用弗氏不完全佐剂,肌肉多点注射,且自第2次免疫起,免疫后1周(眶静脉采血)测血清抗体效价,待血清抗体效价达到要求后于融合前3 d尾静脉注射加强免疫,抗原用量100 μg/(0.1 mL/只);共加强2次。分别从2只BALB/c小鼠的眼球采血:将血液滴入1.5 mL的离心管中,直至不流血为止^[10]。

将盛有血的离心管迅速放入37℃的水浴中,放置1 h,等血液完全溶解,在冰箱中4℃静置过夜

后,4℃、4 000 r/min 离心 10 min 后得上清液即为抗血清。用移液枪吸取上层的血清放入经过预处理的离心管(60℃放置烘箱 5 min)中,在冰箱的冷藏室中保存过夜。

2)纯化 盐析 采用饱和硫酸铵二步沉淀法纯化抗体^[11]。

1.3.4 间接竞争 ELISA 测定方法 包被抗原在包被缓冲液中被稀释成 2 μg/mL,在酶标板每孔中加入 100 μL,密封后 4℃过夜,弃去包被抗原,洗涤液洗涤 3 次,加入 200 μL 封闭液 37℃温育 1 h。每孔加入 100 μL 抗血清,37℃温育 2 h,弃去抗血清,洗涤液洗涤 3 次;每孔加入 100 μL 酶标二抗工作液,37℃温育 1 h,弃去酶标二抗工作液,洗涤液洗涤 3 次;每孔加入 100 μL 底物溶液,37℃避光显色 15 min 后每孔加入 50 μL 终止液终止反应,在酶标仪上读取 450 nm 的吸光度值。

1.3.5 抗血清效价的测定 将抗血清和阴性对照血清进行逐级稀释,空白对照孔不加抗血清而加入 100 μL PBS 溶液。按照 1.3.4 中的 ELISA 法进行测定。以 $A_{阳}/A_{阴} > 2.1$ 的最大稀释倍数作为抗血清的最终效价。

1.3.6 抑制率 IC_{50} 和灵敏度的测定 用 PBS 将灰霉菌标准品稀释成不同质量浓度(1 000、100、10、1、0.1 和 0.01 ng/mL),取 0.2 mL 该溶液和 0.2 mL 适当浓度的抗血清混合,4℃反应过夜。取上述灰霉菌和抗血清混合液 100 μL 按照 1.3.4 间接 ELISA 法进行反应。以 $(A_{阴}-A_{阳}/A_{阴}) \times 100\%$ 接近 50% 时的混合液中的灰霉菌的浓度作为 IC_{50} 。测定阴性孔 10 次,计算 $A_{阴}$ 的 SD,以 $A_{阴}$ 平均值-2SD 混合液中的灰霉菌的浓度作为灵敏度。

2 结果与讨论

2.1 抗原的制备

根据灰霉菌的特性,设计了适合灰霉菌生长繁殖的土豆液体 PDA 培养基培养。将经过传代培养的灰霉菌菌体接种到液体培养基后,每天观察灰霉菌在培养基中的生长状况,在培养的第 12 天,从培养基中提取上清液抗原和多糖抗原,并将制备好的 2 种抗原在冷冻室中保存,分别免疫小鼠。

2.2 多糖抗原和上清液抗原的比较

为了比较 2 种抗原的免疫效果,稀释不同倍数的多糖抗原-抗体和上清液抗原-抗体并测定其 OD_{450} 值。结果见表 1、2。

从表 1、表 2 中的结果可以看出, OD_{450} 值随着抗体浓度的减少而呈现下降趋势。结果表明:多糖

抗原中抗原稀释倍数为 1:5 或 1:2.5,抗体稀释倍数为 1:40、上清液抗体的稀释倍数为 1:150,均可作为间接 ELISA 法检测灰霉菌的参考浓度。从表 1 和表 2 可看出,上清液抗原的免疫效果优于胞外多糖的免疫效果。

表 1 多糖抗原-抗体 450 nm 下吸光度值

Tab. 1 The OD_{450} of exopolyscharides antigen-antibody

抗体 稀释倍数	抗原稀释倍数			
	阴性对照	1:20	1:40	1:80
1:2.5	0.185	1.707	1.546	1.283
1:5	0.121	2.057	1.727	1.576
1:10	0.165	2.183	1.739	1.676
1:20	0.131	2.261	2.029	1.888

表 2 上清液抗原-抗体 450 nm 下吸光度值

Tab. 2 The OD_{450} of supernatant antigen-antibody

抗体 稀释 倍数	抗原稀释倍数					
	阴性 对照	1:20	1:40	1:80	1:150	1:300
1:2.5	0.172	2.220	2.218	2.206	—	—
1:5	0.152	2.401	2.359	2.266	1.489	1.457
1:10	0.356	2.354	2.223	2.194	1.429	1.377
1:20	0.336	2.367	2.202	2.147	1.396	1.354

注:“—”表示未测。

以上数据显示小鼠免疫成功,产生了相应抗体,且浓度较高。由于上清液抗原的免疫效果优于胞外多糖的免疫效果,现以上清液 $OD_{450\text{ nm}}$ 为纵坐标,上清液抗原稀释倍数为横坐标,作折线图来确定最佳抗原包被浓度。

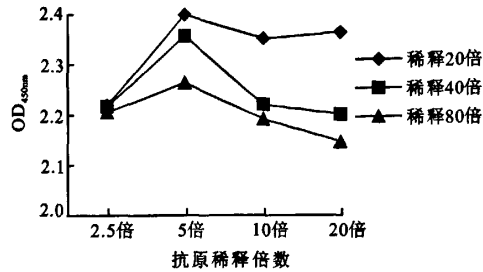


图 1 上清液抗原最佳稀释倍数

Fig. 1 The best dilution times of supernatant antigen

所示抗原 5 倍稀释时,吸光度 450 nm 最大,特异性抗体水平最高,故可确定上清液的最佳抗原包被浓度为 5 倍稀释时的上清液抗原,即 0.2 mg/mL。

2.2 抗血清的效价

通过测定发现,在免疫的过程中,每隔 2 d 抗血清的效价是逐步提高的,尤其是在强化免疫后,它

的效价有显著的提高。由测定结果可知,当包被原质量浓度为 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 时,抗血清效价达 1.06×10^4 ,抗体纯化后冻干粉的效价则达 1.30×10^4 。这说明灰霉菌免疫原的制备是成功的,经纯化后测定吸光值表明纯化后抗体的效价有所提高。

2.3 抗血清的抑制率和灵敏度

用上清液抗原免疫小鼠后得到的抗体对灰霉菌的敏感度为 1.0 ng/mL ,抑制中浓度 IC_{50} 为 1.5 ng/mL ,阴性孔的 A_{492} 平均值 $-2\text{SD} = 1.142 - 2 \times 0.056 = 1.03$,其灵敏度为 1.0 ng/mL 。

3 结 语

在免疫学检测中,抗原和抗体的制备是整个分析方法中最为关键的技术,本实验中由于灰霉菌的抗原的主要成分为多糖和蛋白质类物质,为大分子化合物,本身就具有免疫原性,不需要再偶联大分子化合物就可以作为免疫原来免疫动物了。本实

验中主要是通过灰霉菌抗原制备,免疫小鼠,使小鼠产生多克隆抗体,最终可采用 ELISA 的检测方法对葡萄中灰霉菌进行定量分析。实验通过间接 ELISA 方法已经证实上清液抗原和胞外多糖抗原可使小鼠产生抗体,并且对上清液抗原中的成分进行分离鉴定,可为今后的 ELISA 法快速检测灰霉菌提供一些参考依据。

由于试验条件所限,未能对从上清液中得到的多糖抗原进行分离纯化,它的成分较为复杂,用它作为抗原进行免疫,动物得到的抗体是针对免疫原中所有的成分的。所以在检测时所用的包被抗原不是用来免疫动物的多糖抗原,而是来自国家农产品保鲜中心(天津)提供的经过分离纯化的灰霉菌抗原,依此来增加 ELISA 反应的特异性。试验证明,用多糖抗原制备抗体的路线是可行的。在下一步的继续研究中,可以对得到的上清液多糖抗原进行分离纯化,这样得到的抗体的纯度更高,也会使得 ELISA 反应的特异性大大提高。

参考文献(References):

- [1] 陈宇飞,文景芝,李立军.葡萄灰霉病研究进展[J].东北农业大学学报,2006,37(5):693-699.
CHEN Yu-fei, WEN Jing-zhi, LI Li-jun. Research advance of grape grey mould[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2006, 37(5):693-699. (in Chinese)
- [2] 张从宇,张子学,崔广荣.安徽省番茄灰霉菌抗药性测定和治理[J].植物保护,2006 32(3):32-34.
ZHANG Cong-yu, ZHANG Zi-xue, CUI Guang-rong. Detection and management of the resistance of Botrytis cinerea to fungicides in Anhui Province[J]. *Plant Protection*, 2006, 32(3):32-34. (in Chinese)
- [3] Dewey F M, Meyer U. Rapid, quantitative tube immunoassays for on-site detection of botrytis, aspergillus and penicillium antigens in grape juice[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 513:11-19.
- [4] 陈爱华,杨坚.酶联免疫吸附(ELISA)法在食品微生物检测中的应用[J].中国食品添加剂,2004(4):109-111.
CHEN Ai-hua, YANG Jian. The technology of enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) [J]. *China Food Additives*, 2004(4):109-111. (in Chinese)
- [5] 杨利国,胡永昶,魏平华,等.酶免疫测定技术[M].南京:南京大学出版社,1998:28.
- [6] 李洪燕,王慧燕.液体培养灰霉菌的尝试[J].生物学通报,2004,39(4):24.
LI Hong-yan, WANG Hui-yan. Attempt of culturing fungal by liquid[J]. *Bulletin of Biology*, 2004, 39(4). 24. (in Chinese)
- [7] 李娟兰,李萍.罗伦隐球酵母胞外多糖研究发酵条件[J].真菌学报,1995,14(4):296-31.
LI Shao-lan, LI Ping. Study on extracellular polysaccharide from cryptococcus lavrentii L. conditions of fermentation[J]. *Acta Mycological Sinica*, 1995, 14(4):296-31. (in Chinese)
- [8] 王卫国,吴强,胡保坤,等.几种测定灰树花多糖中蛋白质含量方法的比较研究[J].中国食用菌,2003,22(1):27-30.
WANG Wei-guo, WU Qiang, HU Bao-kun, et al. Comparative study on determination methods of residual protained in grifolan [J]. *Edible Fungi of China*, 2003, 22(1):27-30. (in Chinese)
- [9] 于昕.草莓灰霉菌的分离鉴定及其拮抗菌对枇杷保鲜的研究[D].成都:四川大学,2006:19-20.
- [10] 罗满林,顾为望.实验动物学[M].北京:中国农业出版社,2002. 242-243.
- [11] Cen Haiyan, Bao Yidan, He Yong, et al. Visible and near infrared spectroscopy for rapid detection of citric and tartaric acids in orange juice[J]. *Journal of Food Engineering*, 2007, 82(2):253-260.

(责任编辑:杨萌)