

文章编号:1673-1689(2006)06-0013-05

展青霉素人工抗原及多克隆抗体的研制

邓舜洲, 许杨*

(南昌大学食品科学教育部重点实验室, 江西南昌 330047)

摘要: 采用戊二酸酐法合成展青霉素-半戊二酸(PAT-HG), 通过活泼酯法将 PAT-HG 偶联到牛血清白蛋白, 制备了展青霉素免疫抗原(PAT-HG-BSA), 免疫 3 只 BALB/c 小鼠, 经 4 次免疫后, 1 号小鼠血清抗展青霉素抗体效价达 1:1600, 且小鼠抗展青霉素多克隆抗体与展青霉素检测抗原的结合能被展青霉素阻断。

关键词: 展青霉素; 人工抗原; 多克隆抗体

中图分类号: R 978.1

文献标识码: A

Preparation of Artificial Antigen and Polyclonal Antibody of Mycotoxin Patulin

DENG Shun-zhou, XU Yang*

(Key Laboratory of Food Science, Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The hemiglutarate-patulin (PAT-HG) was prepared by esterification with glutarate, then, it was conjugated to bovine serum albumen(BSA) to form immunogen (PAT-HG-BSA) by ester method. The titer of anti-PAT antibodies in one BLAB/c mice serum, immunized by PAT-HG-BSA, was about 1:1600, in which antibodies binding to PAT-MOVA was inhibited by free patulin.

Key words: patulin; artificial antigen; polyclonal antibody

展青霉素(Patulin, PAT)是由真菌(扩张青霉、展青霉、棒型青霉等)产生的一种次级代谢产物, Glistler(1941)在牛津大学首先发现并分离纯化, 实验发现展青霉素是一种广谱抗生素, 可应用于人感冒的治疗^[1], 但随后的研究证实它对实验动物有较强的毒性, 从此对展青霉素的研究重点转移到其毒性及对食品和饲料的污染上。展青霉素主要污染苹果、山楂及其制品^[2-3], 具急性和亚急性毒性、免疫毒性、致畸、致突变作用等^[4-6], 鉴于展青霉素对

水果的污染以及对人体的危害, 中国和欧盟等国家规定苹果、山楂制品中展青霉素最高允许量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。展青霉素的检测方法主要包括薄层色谱法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)和气相色谱法(GC)等^[7-8], 但上述方法均难以实现对批量样品的快速检测。虽然免疫学检测方法具有特异性强、灵敏度高、实验操作较简单、适于大量样品的快速检测等优点, 已广泛应用多种真菌毒素检测, 但目前国内外尚未见展青霉素免疫学方法检测的报道。

收稿日期:2006-01-05; 修回日期:2006-03-03.

基金项目:国家“十五”重大科技专项课题(国科农社函[2002]130号).

作者简介:邓舜洲(1968-), 男, 江西崇义人, 副教授, 食品科学博士研究生; *为通讯作者.

真菌毒素等小分子物质单克隆抗体研制的前提是制备其人工抗原及免疫动物。作者制备了展青霉素人工抗原,免疫 BABL/c 小鼠产生了抗展青霉素多克隆抗体,为展青霉素单克隆抗体的研制提供了一定的依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

展青霉素(Patulin, PAT)、4-二甲基氨基吡啶(4-Dimethylaminopyridine, DMAP)、N,N'-羰基二咪唑(1,1-Dicyclohexylcarbodiimide, CDI)、戊二酸酐(Glutarate)、牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumen, BSA)、卵清蛋白(Ovumalbumin, OVA)、二环己基碳化二亚胺(Dicyclohexylcarbodiimide, DCC)、氮羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)、

福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂:均为 Sigma 公司产品;铝薄层层析硅胶板:德国 Merck 公司产品;酶标仪:Labsystems 公司产品;Ultrospec 紫外可见光谱仪:美国安玛西亚公司产品;BABL/c 小鼠:购自江西医学院动科部。

1.2 实验方法

1.2.1 制备型薄层层析硅胶板的制备 取质量分数 0.25% 羧甲基纤维素钠水溶液 100 mL,加入 37.5 g 薄层层析硅胶 HF₂₅₄ (HG/T 2354-92),用玻璃棒充分搅匀,平均铺到 3~4 块洁净的玻璃板上(13 cm × 16 cm),在水平的桌面上交替振动玻璃板四角使硅胶均匀分布于玻璃板,自然干燥,110 °C 活化 2 h。

1.2.2 展青霉素免疫抗原(PAT-HG-BSA)的制备

1) PAT-HG 的合成 展青霉素-半戊二酸(PAT-HG)的合成原理见图 1。

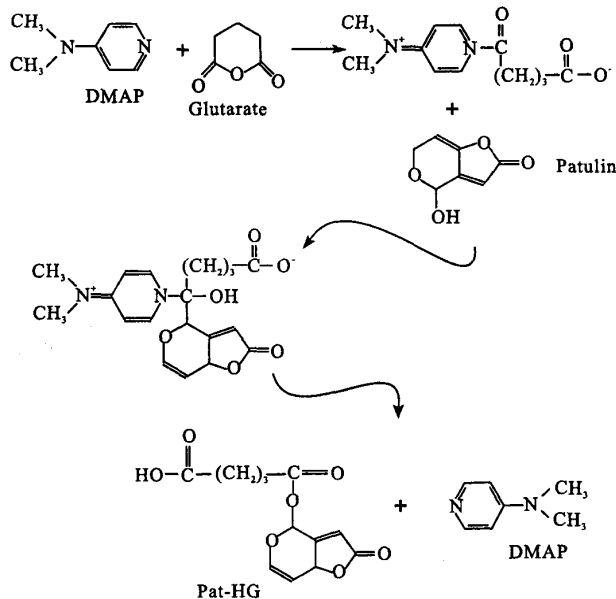


图 1 PAT-HG 合成原理图

Fig. 1 Preparation of PAT-HG

将展青霉素、戊二酸酐和 DMAP 溶于无水四氢呋喃(摩尔比为 1 : 20 : 4),37 °C 振荡反应 2 h (TLC 监控反应),加蒸馏水终止反应。将反应产物点到制备型薄层层析硅胶板上,在展层缸内展层(V(正己烷):V(乙酸乙酯):V(乙醇) = 5 : 3 : 1),256 nm 紫外光下刮下目标产物展青霉素-半戊二酸(PAT-HG)条带,将刮下的硅胶装入离心管中用甲醇洗脱 3 次,真空抽干甲醇,残留物为纯化的 PAT-HG。

2) PAT-HG 与载体蛋白的偶联 PAT-HG 与

载体蛋白的偶联采用活泼酯法,合成原理见图 2。PAT-HG、NHS、DCC 溶于无水四氢呋喃(摩尔比为 1 : 2 : 4),15 °C 振荡反应 6 h (TLC 监控反应);离心除去沉淀,真空抽干四氢呋喃,残留物溶于 DMSO;缓慢滴入溶于 0.13 mol/L NaHCO₃ 的 5% 牛血清白蛋白(BSA)溶液,15 °C 避光条件下,缓慢振荡反应过夜;4 °C 0.1 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)中透析 3 d,冷冻真空干燥,即得展青霉素免疫抗原(PAT-HG-BSA)。

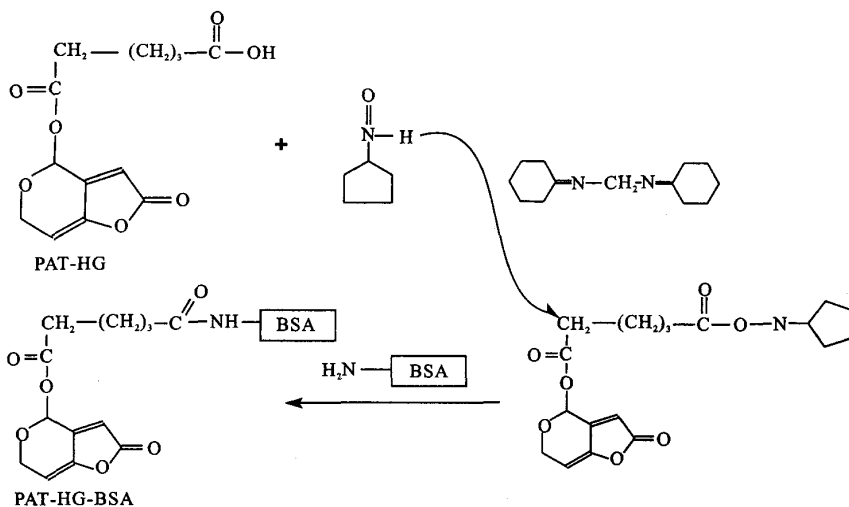


图 2 展青霉素免疫抗原 PAT-HG-BSA 的制备原理图

Fig. 2 Preparation of Patulin immunogen PAT-HG-BSA

1.2.3 展青霉素检测抗原(PAT-MOVA)的制备

1) MOVA(Modified Ovumalbumin)的制备 将 300 mg 鸡卵清蛋白(OVA)和 400 mg EDAC 溶于 15 mL 蒸馏水中,加入质量分数 10% 乙二胺水溶液 1 mL,用 1 mol/L 盐酸调 pH 值至 5.5,室温下缓慢搅拌反应 2 h;再加入 200 mg EDAC,并用 1 mol/L 盐酸调 pH 值至 5.5,室温下继续缓慢搅拌反应过夜,用蒸馏水 4 ℃ 透析 3 d,冷冻真空干燥后 4 ℃ 保存备用^[9]。

2) PAT-MOVA 制备 采用 CDI 法制备展青霉素检测抗原^[10],合成原理见图 3。0.5 mg 展青霉素溶于 300 μL 无水四氢呋喃中,加入 2 mg CDI,37 ℃ 反应 30 min,真空抽干四氢呋喃,残留物溶于 200 μL,加入 2 mg MOVA 溶液(溶于 0.1 mol/L, pH 7.2 磷酸缓冲液),室温条件下缓慢振荡反应 2 h,4

℃ 0.1 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)中透析 3 d,冷冻真空干燥,即得展青霉素检测抗原(PAT-MBSA)。

1.2.4 抗展青霉素多克隆抗体的制备

1) 免疫 BALB/c 小鼠 PAT-HG-BSA 与等量弗氏完全佐剂乳化后经多点皮下注射免疫 3 只 BALB/c 小鼠(200 μg/只);2~4 周后,PAT-HG-BSA 与等量弗氏不完全佐剂乳化后作为免疫原(100 μg/只),皮下、腹腔注射加强免疫,共加强免疫 3 次;最后一次免疫后第 10~14 d 采血,分离血清,检测血清抗体效价。

2) 小鼠血清抗体效价及抗体特异性测定 以 PAT-MOVA 为检测抗原,采用间接 ELISA 法检测小鼠血清抗体效价,竞争间接 ELISA 法检测小鼠血清抗展青霉素多克隆抗体的特异性。

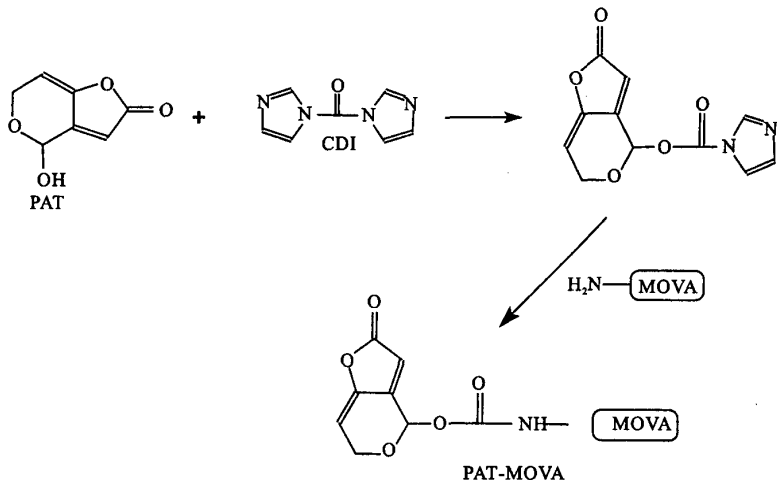


图 3 展青霉素检测抗原的制备原理图

Fig. 3 Preparation of Patulin detective antigen PAT-MOVA

2 结果

2.1 展青霉素人工抗原的制备结果

从图4可看出,随反应时间延长,展青霉素(Patulin)逐渐减少,而展青霉素-半戊二酸(PAT-HG)量不断增加,反应2 h仅见PAT-HG条带,展青霉素条带消失,表明反应完全,且未见明显的副产物。

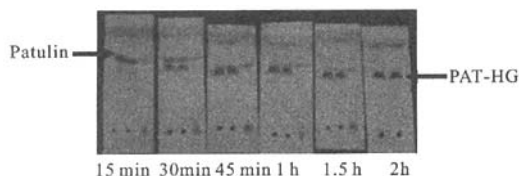


图4 PT-HG制备反应过程TLC监控图

Fig. 4 TLC monitoring picture of PAT-HG preparation

展青霉素、PAT-HG紫外扫描图(图5、6)表明,PAT-HG仍具有展青霉素的特征紫外吸收峰,说明在制备PAT-HG的化学反应过程中未改变展青霉素的结构。但在220 nm的紫外吸收比展青霉素强(由于HG在200~220 nm具有紫外吸收),可推断展青霉素与半戊二酸(HG)连接成功,且通过薄层层析(TLC)纯化得到了较高纯度的PAT-HG。

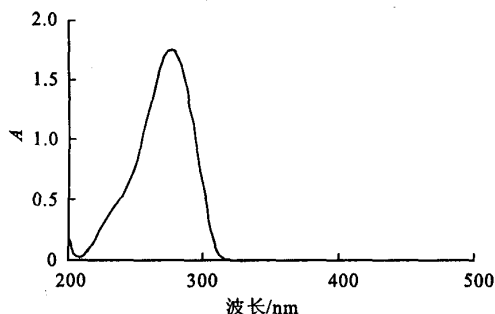


图5 展青霉素标准品紫外扫描图

Fig. 5 The ultraviolet spectrum of PAT

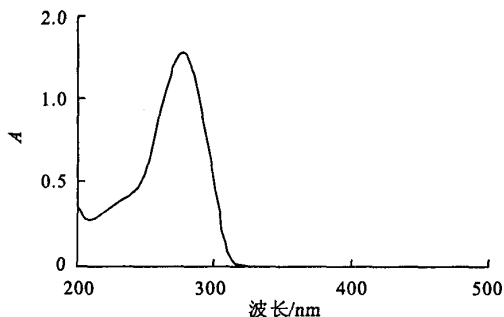


图6 PAT-HG紫外扫描图

Fig. 6 The ultraviolet spectrum of PAT-HG

图7、8结果表明,PAT-HG已偶联到载体蛋白BSA上,PAT-HG-BSA的紫外吸收峰为BSA、PAT-HG二者的叠加紫外吸收峰。除280 nm外,展青霉素无其他紫外吸收特征,因此,作者通过280 nm的叠加值计算合成的展青霉素人工抗原中展青霉素与载体蛋白的偶联比。经计算,免疫抗原PAT-HG-BSA的偶联比为10:1(每个BSA分子上平均偶联10个展青霉素分子),展青霉素检测抗原(PAT-MOVA)的偶联比为7:1。

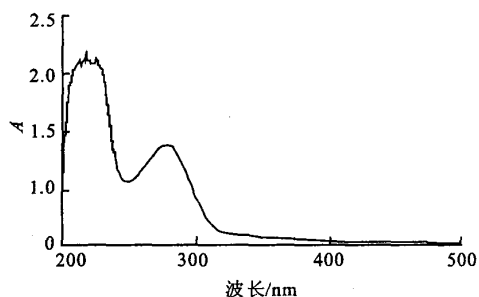


图7 PAT-HG-BSA紫外扫描图(蛋白质质量浓度0.5 mg/mL)

Fig. 7 The ultraviolet spectrum of PAT-HG-BSA (the protein concentration is 0.5 mg/mL)

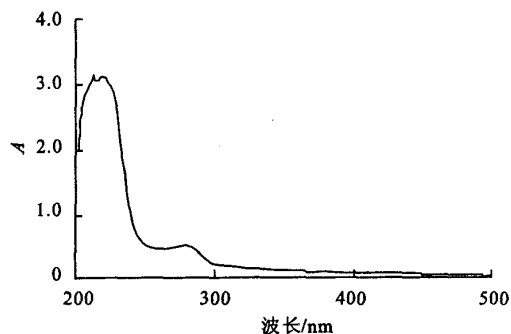


图8 BSA紫外扫描图(蛋白质质量浓度0.5 mg/mL)

Fig. 8 The ultraviolet spectrum of BSA (the protein concentration is 0.5 mg/mL)

2.2 抗展青霉素多克隆抗体的制备结果

第三次加强免疫后10 d,采血分离血清,以PAT-MOVA为检测抗原,间接ELISA法测定血清抗体效价,其中1只小鼠血清抗体效价为1:1600,另2只小鼠血清抗体效价为1:200。

2.3 小鼠多抗展青霉素克隆抗体特异性

以展青霉素人工抗原(PAT-MOVA)为检测抗原,竞争间接ELISA法测定抗展青霉素多克隆抗体的特异性(图9),显示小鼠血清多克隆抗体与展青霉素检测抗原的结合能被展青霉素标准品阻断,说明免疫小鼠产生了抗展青霉素特异性抗体。

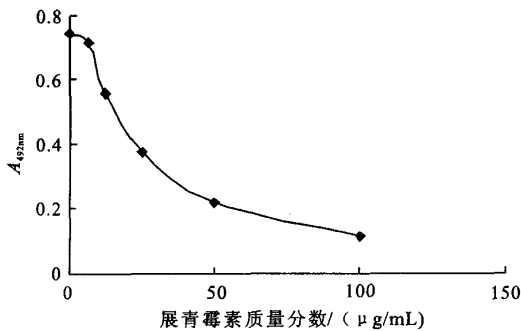


图9 小鼠抗PAT血清的间接竞争ELISA曲线

Fig. 9 The indirect competitive ELISA curve of mouse anti-PAT antibody

3 讨论

展青霉素是一种小分子化学物质,无免疫原性,要制备抗展青霉素抗体,必须将其偶联到相对分子质量较大的载体上(如BSA、OVA等)。由于展青霉素结构简单,只有羟基能用于活化与载体蛋白偶联。McElroy等(1993)报道了展青霉素人工抗原制备方法,将10 mg展青霉素、2 g戊二酸酐、0.7 g DMAP(摩尔比为1:2750:883)溶于55 mL无水四氢呋喃,回流45 min后加10 mL水终止反应,用硅胶柱纯化展青霉素活化产物(PAT-HG)^[11]。实验显示,随着戊二酸酐和DMAP的量增加、或反应温度升高,反应的副产物也逐渐增加,通过优化反应条件,降低了戊二酸酐活化展青霉素羟基的反应温度、戊二酸酐和DMAP的用量,展青霉素、戊二酸酐和DMAP的摩尔比为1:20:4,37℃振荡反应2 h,可充分活化展青霉素(见图4)。

目前展青霉素的检测方法主要包括TLC、HPLC

和GC,但这3种方法都难以实现对批量样品的快速检测。虽然免疫学检测方法具有特异性强、灵敏度高、实验操作较简单等优点,广泛应用于食品中真菌毒素检测,但目前国内外尚未见展青霉素免疫学检测方法的报道,其原因可能是由于展青霉素的不稳定性^[11-16]。

作者在展青霉素人工抗原合成过程中采用了不同的化学方法、不同的载体蛋白制备免疫抗原和检测抗原,减少了交叉反应。结果表明,如以PAT-HG-OVA(制备方法与免疫抗原相同)为检测抗原,间接ELISA方法检测本实验的3只免疫小鼠血清中的抗体效价均达1:50 000以上。其原因可能是展青霉素在不同偶联方法制备的人工抗原中的分解途径不同,以PAT-MOVA为检测抗原可针对性检测出小鼠血清中抗展青霉素特异性抗体。由于动物个体差异,用相对分子质量较小、结构简单的真菌毒素人工抗原免疫一批小鼠,只有少数小鼠能产生较高水平的特异性抗体,因此本方法可减少今后制备抗展青霉素单克隆抗体时对免疫小鼠选择的盲目性。

由于展青霉素的不稳定性,接种到小鼠体内的展青霉素人工抗原容易分解,致使免疫小鼠难以产生高水平抗展青霉素的特异性抗体,为筛选到分泌抗展青霉素单克隆抗体的杂交瘤细胞增加了难度,实验免疫的3只小鼠中只有1只产生了较低水平的抗展青霉素抗体,目前课题组正在试图提高小鼠抗展青霉素多抗的效价。总之,制备抗展青霉素单克隆抗体,建立展青霉素免疫学检测方法,首先必须解决展青霉素的稳定性,或在展青霉素降解前使动物的免疫系统识别免疫抗原中的展青霉素部分,产生针对展青霉素的特异性抗体。

参考文献:

- [1] Gye W E, Edin M D. Patulin in the common cold[J]. *The lancet*, 1943, 243: 625-635.
- [2] Gokmen V, Acar J. Long-term survey of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey[J]. *Food Addit Contam*, 2000, 17(11): 933-936.
- [3] 宋家玉, 邢金川, 林艺, 等. 山东省部分水果及制品中展青霉素污染调查分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 1995, 7(2): 43-44.
- [4] 藏家仁. 牙克石地区雏鸭霉高粱中毒的病因研究[J]. *兽医大学学报*, 1992, 12(4): 324-327.
- [5] Smith E E, Duffus E A, Small M H. Effects of patulin on postimplantation rat embryos[J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1993, 25(2): 267-270.
- [6] Escoula L, Bourdiol D, Linas M D. Enhancing resistance and modulation of humoral immune response to experimental *Candida albicans* infection by patulin[J]. *Mycopathologia*, 1988, 103(3): 153-156.
- [7] Tarter E J. Determination of patulin by capillary gas chromatography of the heptafluorobutyrate derivative[J]. *Journal of Chromatography*, 1991, 538: 441-446.

(下转第53页)

以 Be-7 号菌株为最优, Be-7 号菌株菌丝分枝多且均匀, 生长速度快, 菌丝生长茂盛, 在 28 ℃, pH 5.4 ~ 5.8 下, 以马铃薯 10 g/dL, 蔗糖 2 g/dL, 豆饼粉

0.6 g/dL, KH_2PO_4 0.3 g/dL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/dL, CaCO_3 0.2 g/dL 发酵培养基上进行液体发酵, 胞外多糖产量比出发菌株高 30.40%。

参考文献:

- [1] 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京: 中国农业出版社, 1993. 147.
- [2] 赵国华, 陈宗道, 李志孝, 等. 活性多糖研究新进展[J]. 食品与发酵, 2001, 27(7): 45—48.
- [3] 唐薇, 鲁新成. 美味牛肝菌多糖的生物活性及其抗 S-180 肿瘤的效应[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 1999, (4): 478.
- [4] 谭琦, 潘迎捷, 黄为一. 中国香菇育种的发展历程[J]. 食用菌学报, 2000, 7(4): 48—52.
- [5] 戴秉丽. 原生质体技术在食用菌育种中的应用研究[J]. 中国食用菌, 1995, 14(5): 15—16.
- [6] 李刚, 李宝健. 灵芝原生质体分离与再生研究[J]. 菌物系统, 1999, 18(1): 79—88.
- [7] 刘士旺, 梁宗琦, 刘爱英. 羊肚菌原生质体制备及其再生[J]. 西南农业学报, 1997, 10(4): 75—80.
- [8] 于彦春, 王玉, 李玉祥. 榆黄蘑原生质体分离和再生的研究[J]. 吉林农业大学学报, 1999, 21(2): 26—29.
- [9] 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所编. 食物营养测定法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991.
- [10] 张吉福, 蔡同一, 郭顺星. 灵芝原生质体再生和诱变菌株的培养特性及多糖的研究[J]. 食品工业科技, 2000, 21(1): 12—13.
- [11] 金玲, 武艳霞, 周宗俊, 等. 原生质体辐射诱变培育金针菇新菌株[J]. 园艺学报, 2000, 27: 65—66.
- [12] Fevre M, Girard V, Nodet P. Biochemistry of cell walls and membrane in fung[M]. Berlin: Springer Press, 1990. 12—14.
- [13] Concepcion G M. Morphological and ultrastructural studies on protoplast production and reversion of the high *Basidiomycete garicus bisporus*[J]. *Current Microbiol*, 1991, 22: 191—194.

(责任编辑: 李春丽)

(上接第 17 页)

- [8] Gökmen V, Acar J. Rapid reversed-phase liquid chromatographic determination of patulin in apple juice[J]. *Journal of Chromatography A*, 1996, 730: 53—58.
- [9] Chu F S, Lau H P, Fan T S, et al. Ethylenediamine modified bovine serum albumin as protein carrier in the production of antibody against mycotoxins[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1982, 55: 73—78.
- [10] Sinha R C, Savard M E, Lau R. Production of monoclonal antibodies for the specific detection of deoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol by ELISA[J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43: 1740—1744.
- [11] McElroy L J, Weiss C M. The production of polyclonal antibodies against the mycotoxin derivative patulin himeglutamate [J]. *Can J Microbiol*, 1993, 39: 861—863.
- [12] Fliege R, Metzler M. Electrophilic properties of patulin N-acetylcysteine and glutathione adducts[J]. *Chem Res Toxicol*, 2000, 13: 373—381.
- [13] Fliege R, Metzler M. Electrophilic properties of patulin adduct structures and reaction pathways with 4-Bromothiophenol and other model nucleophiles [J]. *Chem Res Toxicol*, 2000, 13: 363—372.
- [14] Rychlik M. Rapid degradation of the mycotoxin patulin in man quantified by stable isotope dilution assays[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2003, 20(9): 829—837.
- [15] Morgavi D P, Boudra H, Jouany J P, et al. Prevention of patulin toxicity on rumen microbial fermentation by SH-Containing reducing agents[J]. *J Agric And Food Chemistry*, 2003, 51: 6906—6910.
- [16] Alves I, Oliveira N C, Laires A, et al. Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity [J]. *Mutagenesis*, 2000, 15: 229—234.
- [17] Sheu F, Lee O, Shyu Y T. The synthesis of antigens and the production of antibodies against patulin derivatives [J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 1999, 7(1): 65—72.

(责任编辑: 朱明)