文章编号:1673-1689(2007)05-0099-05

黄曲霉毒素 B_1 完全抗原构建中结合位点研究

孙秀兰[1]， 张银志[2]， 汤 坚[2]， 朱 瑜[3]

(1. 江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 分析测试中心，江苏 无锡 214122；3. 陕西省汉中市质检所，陕西 汉中 724000)

摘 要：通过衍生化反应，合成了 AFB_1 羧甲基活化物，然后利用碳二亚胺法合成 AFB_1－O－BSA 偶联物，构建 AFB_1 完全抗原，并通过多种光谱和质谱对合成完全抗原过程中偶联比和结合位点进行研究。通过荧光光谱在分子水平上探讨 AFB_1 与 BSA 载体蛋白的偶联机制及偶联反应对 BSA 的构象影响，推测黄曲霉毒素和牛血清白蛋白反应的结合部位，同时发生在 BSA 的酪氨酸残基和色氨酸残基上，使得 BSA 疏水性增加，肽链伸展程度降低。

关键词：黄曲霉毒素 B_1；完全抗原构建；结合位点

中图分类号：Q 949.327.1 **文献标识码**：A

Study on the Binding Site in the Construction of AFB_1 Complete Antigen

SUN Xiu-lan[1]， ZHANG Yin-zhi[2]，TANG Jian[2]， ZHU Yu[3]

(1. School of Food Science and Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. Testing and Analysis Center，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；3. Hanzhong Quality Supervision and Inspection Bureau，Hanzhong 724000，China)

Abstract: To study the coupling ratio and the binding site of AFB1 and BSA during the construction of the AFB1 complete antigen, AFB1-carboxymethyl and AFB1-O-BSA complexation were synthesized by carbondiimide method. Different kind of spectroscopy and mass spectra methods was employed. The mechanism of the coupling and the effects to the structure of the BSA were investigated in the molecular level. The results showed that the binding sites of the AFB1 and BSA were both situated in the Tyr and Trp residue of the BSA. The binding made the increasing of the hydrophobicity of the BSA and the decreasing of the extension of the peptide chain.

Key words: aflationxin B_1; immuno-antigen; conjuation location

半抗原(hapten)是指不含蛋白质成分的有机小分子，它可以和抗体反应，但是不能诱发机体产生免疫应答，即有免疫反应性，而无免疫原性[1-2]。为了得到半抗原的特异性抗体，首先必须将半抗原与某一特定结构的生物大分子结合，形成完全抗原，这种生物大分子被称为载体。抗体的特异性决定于完全抗原中半抗原分子决定簇，而载体蛋白分子决定了宿主对半抗原免疫应答的性质和量[3]。黄曲霉毒素 B_1(AFB_1) 是小分子的有机化合物，相对分子质量仅为 312.04，是一种典型的半抗原。作者以 BSA 为载体蛋白，用 EDC 法合成 AFB_1 完全抗原，对其进行结构鉴定和构象分析，研究其结合过程中位点的连结情况，为建立快速准确检测 AFB_1 的免疫学方法提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

AFB_1，AFB_2，AFG_1，AFG_2，羧甲基羟胺半盐

收稿日期：2006-06-13.

作者简介：孙秀兰(1976-)，女，山东聊城人，副教授，工学博士，主要从事食品安全检测研究. Email：sxlzzz@yahoo.com.cn

万方数据

酸盐，碳二亚胺盐酸盐(EDC)，福氏完全佐剂和不完全佐剂：Sigma公司产品；牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA)：华美公司产品；四氢呋喃、吡啶、二甲基甲酰胺、甲醇、氯仿、碳酸氢钠：分析纯试剂。

1.2 实验仪器

紫外可见光分光光度计：Spectronic 1.70 GBC；傅立叶红外光谱仪：Win－IR Bio－Rad产品；酶标仪：MK3 Labsystems Dragon Wellscan,；ESI质谱仪：Waters Platform ZMD 4000，Waters公司产品；电泳设备：DYY-38，北京六一仪器厂产品；荧光光谱仪：RF-5301PC，日本岛津公司产品；旋转蒸发仪：WBG 1-4002；磁力搅拌器：RCT IKA；薄层扫描仪：CAMAG TLC SCANNER 3，瑞士卡玛公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 AFB_1的活化 根据Morgan报道的方法并加以改进[4-8]。

(1)10 mg AFB_1溶于6 mL(V(甲醇)：V(水)：V(吡啶)=4：1：1)混合液中，加入20 mg羧甲基羟胺半盐酸盐，85 ℃回流3 h，室温放置过夜，旋转蒸发仪减压蒸除溶剂。

(2)所得沉淀物用少量氯仿溶解，以V(氯仿)：V(甲醇)=9：1为展开剂，与标准AFB_1的展开值R_f进行对照，R_f值为0.25左右的是AFB_1的活化物，R_f值为0.75左右的组份是没有转化的AFB_1，收集活化物组份，待第二次薄层层析进行纯化。

(3)收集AFB_1活化物，用少量的甲醇溶解，待用。

1.3.2 AFB_1完全抗原的合成

(1)取AFB_1活化物5 mg于5 mL的磨口烧瓶中，加5 mL无水二甲基甲酰胺(DMF)溶液使其溶解，置4 ℃冰箱中冷却。取50 mg碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶于1.0 mL蒸馏水中，取44 mg BSA溶于4.0 mL 0.01 mol/L磷酸缓冲液(PBS，pH 7.4)中，冰箱中冷却待用[7-10]。

(2)在磁力搅拌的同时，将0.5 mL EDC溶液逐滴加入AFB_1溶液中，4 ℃搅拌，避光反应1 h。在反应液中缓慢滴加BSA溶液，继续搅拌反应1 h后，再加入0.5 mL EDPC溶液，4 ℃下反应16 h。

(3)将产物溶液用0.01 mol/L PBS溶液在4 ℃下透析72 h，每12 h换透析液一次，用小瓶分装，真空冷冻干燥后，置4 ℃保存。用相同的方法将AFB_1-羧基化合物与OVA进行偶联合成AFB_1-OVA偶联抗原。

1.3.3 AFB_1多抗血清的免疫反应性 为了验证完全抗原的免疫原性，作者选择健康的雄性新西兰大白兔为免疫动物，检测了所产生抗体的反应特异性。结果说明：所构建的完全抗原具有很好的刺激动物产生抗体的能力[11]，免疫12周抗体效价达到25 600左右。作者以AFB_1及其结构类似物，黄曲霉毒素B_2(AFB_2)、黄曲霉毒素G_1(AFG_1)、黄曲霉毒素G_2(AFG_2)作为竞争抗原，研究了它们对获得的兔抗血清的竞争抑制反应性。结果显示，获得的抗血清对AFB_1的竞争抑制性最强，抑制率为100%，对AFB_2，AFG_1，AFG_2竞争抑制性依次降低。3种结构类似物的交叉反应率分别为：AFB_2 28%，AFG_1 27%，AFG_2 11%。该结果也证实了制备的完全抗原具有很好的免疫原性。

2 结果与讨论

2.1 AFB_1完全抗原的构建原理

由于AFB_1本身的性质不活泼，不具有能和蛋白质连接的活性基团，因此首先要通过适当的衍生化方法，将活性基团引入AFB_1中。制备AFB_1完全抗原的反应路线如图1所示。

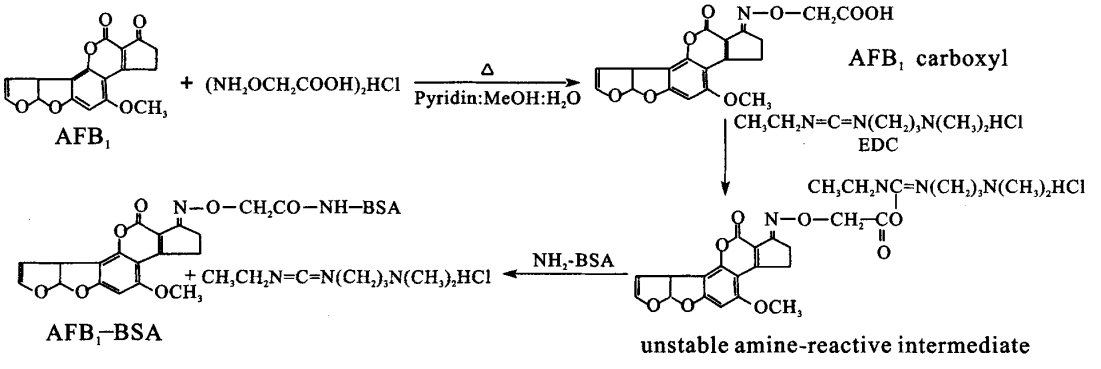


图1 AFB_1-BSA完全抗原的合成路线

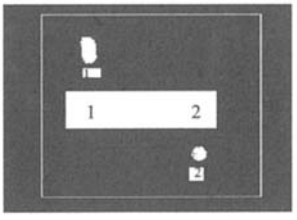
Fig. 1 The synthesis path of AFB_1-BSA complete antigen

万方数据

首先是引入活性基团羧基。半抗原分子中与载体蛋白结合的位点的选择将影响到抗体免疫特异性，选择半抗原结构类似物分子上共有基团作为偶联位点时，免疫动物产生的抗体具有较好的特异性。因此，作者选择 AFB_1 分子中环戊酮环上 C_3 位作为活化位点，将 C_3 位的羰基转化为 N-O-甲基羧酸。沿用甾族化合物羧基化反应的方法，以吡啶为催化剂，AFB_1 在甲醇水溶液中，通过加热回流，AFB_1 转化为 AFB_1 羧基活化物。然后 AFB_1 羧基活化物与蛋白合成的催化剂碳二亚胺(EDC)作用形成复合物，复合物是极不稳定的中间产物，中间产物分解，AFB_1 的羧基迅速与载体蛋白 BSA 的氨基发生羧胺反应，形成稳定的偶联产物。

2.2　AFB_1 羧基活化物的结构鉴定

AFB_1 活化后化学组成为 $C_{19}H_{15}NO_8$，分子的特征基团(呋喃环和香豆素结构)未发生显著改变。图 2 分别显示的是 AFB_1 和 AFB_1 羧基活化物(AFB_1—Oxime，简写为 AFB_1—O)的薄层色谱的鉴定结果。展开溶剂系统为 V(甲醇)：V(氯仿)＝1：9，展开距离为 15 cm，检测波长为 361 nm。由图 2 可知，AFB_1 分子经活化后，展开距离大大降低，R_f 为 0.25，AFB_1 为 0.78。将层析分离纯化的 AFB_1—O 进行紫外吸收光谱分析(见图 3)。在甲醇溶剂中，AFB_1—O 有 4 个吸收峰分别是 209 nm，223 nm，265 nm 和 361 nm，与 AFB_1 特征吸收峰基本一致。



1. AFB_1；2. AFB1—O

图 2　AFB_1—O 的薄层层析图谱

Fig. 2　Photo of TLC of AFB_1—O

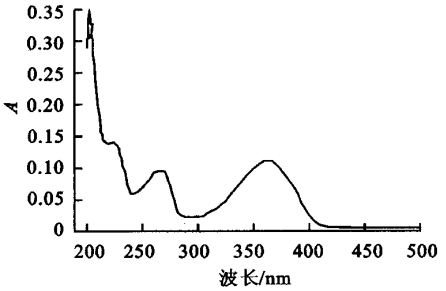


图 3　AFB_1—O 的紫外吸收图谱

Fig. 3　UV spectra of AFB_1—O

图 4 显示的是 AFB_1 羧基活化物的电喷雾质谱图。m/z 408.4 是 AFB_1 羧基活化物的准分子离子峰，$[AFB_1—O+Na]^+$，由此算出，活化物的相对分子质量为 385.4，与应得产物 $C_{17}H_{12}O_6$ 的相对分子质量基本一致。m/e 334.6 为 AFB_1 羧基活化物分子断裂而成的碎片峰，$[AFB_1+Na]^+$，与 AFB_1 的相对分子质量相一致。综合 TLC 和 MS 的分析结果，可以初步断定活化产物即是 AFB_1 羧基化合物。根据 AFB_1—O 在 361 nm 处的 A 值及摩尔消光系数 20 950，计算活化产物 AFB_1—O 的产量为 8.36 mg，产率为 83.6%。

2.3　AFB_1—O—BSA 偶联物的纯化和结构鉴定

为了鉴定偶联产物的纯度，在透析结束后进行了 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳实验。结果显示，纯化所得的产物呈现一条谱带，与 BSA 相比，该条带出现的位置相同，说明经纯化后的偶联产物达到一定纯度要求，可以进行系列的结构鉴定。

BSA 是一种典型的血清蛋白，在 280 nm 具有特征吸收峰，AFB_1—O 在 361 nm 具有特征吸收峰。对合成的偶联物进行紫外光谱分析，结果如图 5 所示。偶联物在 280 nm 和 361 nm 处同时表现出了明显的吸收峰，而且由于两者之间的迭加效应，吸收峰的位置有轻微的位移。由此，可初步判断，AFB_1—O和 BSA 已经偶联上了。

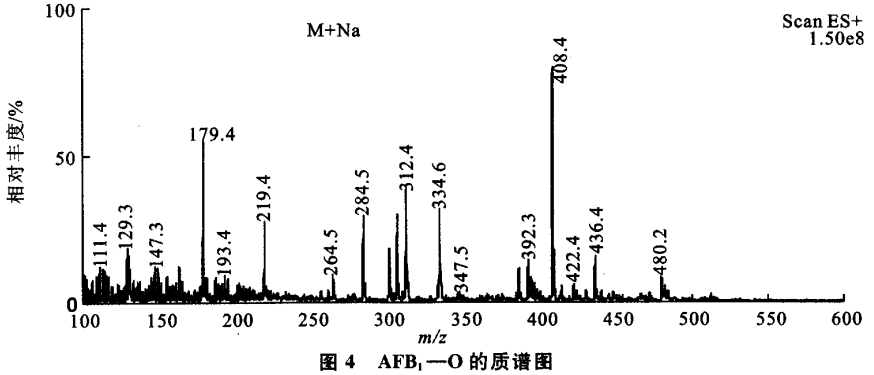
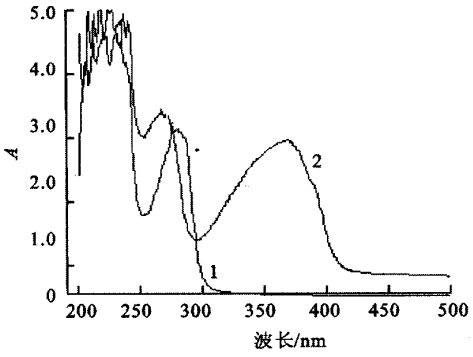


图 4　AFB_1—O 的质谱图

Fig. 4　The ESI Mass spectrum

万方数据

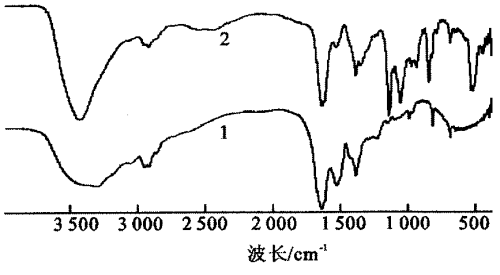


1. BSA; 2. AFB_1—O—BSA

图5 AFB_1—O—BSA偶联物的紫外光谱

Fig. 5 UV spectra of AFB_1—O—BSA

图6显示的是AFB_1—O—BSA偶联物与BSA的红外光谱图。由图看出，两者之间存在显著差异。BSA的红外光谱显示了蛋白质所共有的谱带，酰胺有二个特征吸收称为Ⅰ带、Ⅱ带，其中Ⅰ带位于1 640 cm^{-1}的为酰胺中羰基的伸缩振动所产生；Ⅱ带位于1 550 cm^{-1}，属N—H弯曲。AFB_1—O—BSA偶联物的红外光谱图基本显示出BSA的特征吸收谱带，但是与BSA相比，偶联物在1 156 cm^{-1}和1 073 cm^{-1}显示出明显吸收峰。因为偶联物中BSA本身的酰胺谱带非常明显，所以无法从反应生成的新的酰胺键来判断。而AFB_1—O结构中有些特征基团如1 735 cm^{-1}的戊酮、1 630 cm^{-1}的C=N键等，也由于受BSA吸收峰的影响表现并不明显。但在1 100 cm^{-1}附近仍可显示明显的AFB_1—O结构中的C—O—C键宽带吸收峰。结合紫外光谱分析，可以认为，AFB_1—O与BSA确已发生了偶联反应。



1. BSA; 2. AFB1—O—BSA

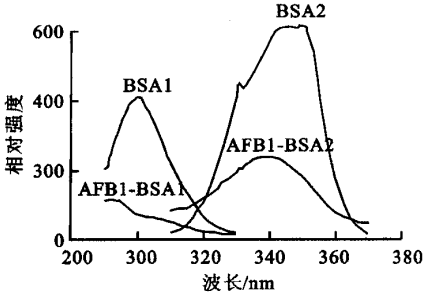
图6 AFB_1—O—BSA偶联物红外光谱

Fig. 6 IR-Spectrum of AFB_1—O—BSA

2.4 AFB_1—O—BSA偶联物的荧光光谱分析

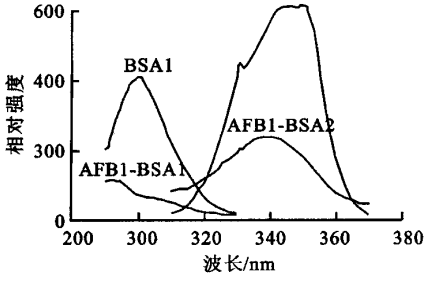
BSA作为一种载体蛋白决定了AFB_1在动物体内的免疫应答的效应。载体蛋白的这种特异性主要反映在它本身的结构特性，只有具有特定组成和特定构象的物质才有诱导免疫应答的作用。虽然前面的研究结果已经证明AFB_1确已与BSA发生了偶联反应，但是对于偶联反应的结合部位和偶联前后BSA蛋白质的构象变化尚不清楚。

BSA因为色氨酸和酪氨酸的存在使其具有较强的内源荧光[11,12]。而AFB_1—O具有共轭基团，也具有一定的内源荧光。图7显示的是相同浓度的BSA和AFB_1—O—BSA的荧光发射光谱(a)和同步荧光光谱(b)。由图7(a)可知，AFB_1—O—BSA与BSA发生反应后可引起BSA的荧光性质发生改变，首先表现在，BSA蛋白质的内源荧光被淬灭，其次是荧光发射谱带发生改变。在280 nm作为激发波长时，BSA荧光发射峰分别在341，561，671，840 nm，荧光强度很大。发生偶联后，AFB_1—O—BSA在相同激发条件下，荧光强度显著降低，说明AFB_1—O对BSA具有荧光淬灭作用，峰位置为310，443，561，621，838 nm。与偶联前相比，产生了443nm荧光峰，推测是AFB_1—O的引入所产生的。从荧光淬灭机理分析，AFB_1—O和BSA发生了偶联反应形成了复合物，属于静态淬灭。



1. BSA; 2. AFB_1—O—BSA偶联物

(a)BSA与AFB_1—O—BSA荧光发射光谱 C_{BSA}：1.9×10^{-8} mol/L



1. 酪氨酸残基的同步荧光光谱；2. 色氨酸残基的同步荧光光谱

(b) BSA与AFB_1—O—BSA的同步荧光光谱 C_{BSA}：1.9×10^{-8} mol/L

图7 AFB_1—O—BSA与BSA的荧光光谱比较

Fig. 7 Fluorescence spectrum of AFB_1—O—BSA and BSA

(使激发波长和发射波长保持固定的波长间距($\Delta\lambda$)，同步扫描激发和发射单色器，可得到同步荧光谱图，蛋白质的同步荧光光谱已被用来判断蛋白质的构象变化。由$\Delta\lambda=15$ nm所得的同步荧光光谱图仅显示蛋白质酪氨酸残基的光谱特征；由$\Delta\lambda=60$ nm所得到的同步荧光谱图仅显示蛋白质色氨酸

万方数据

残基的光谱特征。因残基的最大发射波长与其所处环境的极性有关，故由发射波长的改变可判断蛋白质的构象变化。图 7(b)显示的是在相同条件下 BSA 和 AFB_1—O—BSA 的同步荧光光谱。与 BSA 相比，AFB_1—O—BSA 偶联物的酪氨酸残基和色氨酸残基的最大发射波长均发生了明显的蓝移，荧光强度也显著降低。推测两者反应影响了 BSA 的酪氨酸残基和色氨酸残基，使得 BSA 疏水性增加，BSA 内部的疏水结构增强，肽链伸展程度降低。荧光强度的降低也可能与附近别的残基上正电荷消失有关。色氨酸残基的最大发射波长从 352 nm 蓝移至 340 nm，根据判别规则[12]，推测这是由于 BSA 更多的暴露于溶剂中造成的。

2.5　抗原的偶联比及免疫原性检测

蛋白载体 BSA 分子上 AFB_1—O 上偶联的数量对抗体的生成有较大的影响，过少或过多，都不能获得满意的抗体。AFB_1—O 与 BSA 反应的起始摩尔比是影响偶联比的重要因素，起始摩尔比增加，偶联产物的摩尔比也会增加。本实验中 AFB_1—O 与载体蛋白 BSA 起始摩尔比为 20∶1，采用二甲基甲酰胺 DMF 和 PBS(pH7.4) 溶液混合溶剂系统，偶联比为 9.34∶1，利用率为 46.7%，而用乙醇-水溶剂系统反应后的偶联比为 4.35∶1，利用率仅为 21.75%。偶联比和利用率的计算参考文献[14]进行。作者用获得的抗原进行动物免疫，制备了 AFB_1 特异性兔抗血清，经间接非竞争 ELISA 测定，效价为 25,600。与其结构类似物的交叉反应率为 AFB_2 28%，AFG_1 27%，AFG_2 11.1%。结果证实了所构建的完全抗原具有良好的免疫原性。

3　结　语

1) 通过衍生化反应，合成了 AFB_1 羧甲基活化物。利用碳二亚胺法合成 AFB_1—O—BSA 偶联物，构建 AFB_1 完全抗原并进行结构鉴定。起始摩尔比和合适的反应溶剂系统是提高偶连比和 AFB_1—O 利用率的主要因素。

2) 首次通过荧光光谱在分子水平上探讨 AFB_1 与 BSA 载体蛋白的偶联机制及偶联反应对 BSA 的构象影响。结果表明，AFB_1—O 对 BSA 具有荧光淬灭作用，荧光淬灭模式为静态淬灭。荧光发射谱带发生改变，并且在 443 nm 产生了 AFB_1—O 的特征荧光峰。

3) 制备了 AFB_1 特异性兔抗血清，经间接非竞争 ELISA 测定，效价为 25 600。与其结构类似物的交叉反应率为 AFB_2 28%，AFG_1 27%，AFG_2 11.1%。结果证实了所构建的完全抗原具有良好的免疫原性。

参考文献(References)：

[1] 王重庆. 分子免疫学基础[M]. 北京：北京大学出版社，1999,24－28.

[2] 沈关心，周如麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉：湖北科学技术出版社，1998.

[3] Apple R J, Domen P J , Muckerheide A, et al. Cationization of protein antigens. Increased antigen uptake by antigen-presenting cells[J]. **J Immunol**, 1988, 140: 3290－3295.

[4] 朱立平，陈雪清. 免疫学实验技术[M]. 北京：军医出版社，2000.

[5] 江湖，熊勇华，许杨，等. EDC 法制备黄曲霉毒素人工抗原的研究[J]. 食品科学，2005,26(7):125－128.
JIANG Hu, XIONG Yong-hua, XU Yang, et al. Preparation of aflatoxin B_1 artificial antigen by EDC method[J]. **Food Science**, 2005,26(7):125－128. (in Chinese)

[6] Chu F S, Hsia S M T, Sun P S. Preparation and characterization of aflatoxin B1-oxime[J]. **J AOAC**, 1977,60, 791－794.

[7] Gendloff E H, Casal W L, Ram H P, et al. Hapten-protein conjugate prepared by the miced anhydride method[J]. **J Immunol Methods**, 1986,92,15.

[8] 陈福生，罗信昌，周启，等. 黄曲霉毒素 B_1 的免疫检测Ⅰ抗原的制备[J]. 菌物系统，1999,18(3):316－320.
CHEN Fu-sheng, LUO Xin-chang, ZhOU Qi, et al. Immunological detection of aflatoxin B_1 I. preparation of aflatoxin B_1 antigen[J]. **Fungal Systematics**, 1999,18(3):316－320. (in Chinese)

[9] Chu F S, Ueno I. Production of antibody against aflatoxin B_1[J]. **Applied and Environment Microbiology**, 1977,23(6):1125－1128.

[10] 陈福生，李根久. 黄曲霉毒素 B_1 抗原的构建[J]. 卫生研究，1998,27 (增):133－138.
CHEN Fu-sheng, LI Gen-jiu. The construction of aflatoxin B_1 antigen[J]. **Journal of Hygiene Research**, 1998,27 (supplement):133－138. (in Chinese)

[11] 蒋成，陶义训. 酶联免疫测定法[M]. 北京：人民卫生出版社，1984,40.

[12] 王敬政，贺古香，江祟球. 芦荟大黄素与血清白蛋白的相互作用[J]. 分析化学，2001,29(7):782－784.
WANG Jing-zhen, HE Gu-xiang, JIANG Chong-qiu. The Interaction of Serum Albumin with Aloe-emodin[J]. **Chinese Journal of Analytieal Chemistry**, 2001,29(7):782－784. (in Chinese)

(责任编辑：朱　明)

万方数据