

双交联法制备桔霉素-蛋白质偶联抗原及抗体*

汪媛媛¹⁾ 李泳宁²⁾ 郭养浩^{1, 2)**}

(¹⁾福州大学生物科学与工程学院, 福州 350002; ²⁾福建省医疗器械与医药技术重点实验室, 福州 350002)

摘要 以 1,4-丁二醇二缩水甘油醚(双环氧试剂)为偶联剂, 合成桔霉素-蛋白质偶联抗原 CIT-BSA, 经过 HPLC 分析、紫外扫描和红外光谱鉴定表明, 偶联物成功制备, CIT/BSA 的偶联比为 8.16。通过免疫 BALB/C 小鼠, 获得抗桔霉素多克隆抗体, 经间接 ELISA 检测, 效价达到 1.1×10^5 。间接竞争 ELISA 表明, 桔霉素(CIT)的最低检测浓度为 $10 \mu\text{g/L}$, 其线性范围为 $10 \sim 250 \mu\text{g/L}$, IC_{50} 为 $100 \mu\text{g/L}$ 。分析了不同方法制备的偶联抗原的免疫原性, 实验表明, 桔霉素抗原决定簇 C₇ 位置的羧基保留是获得针对桔霉素特异性抗体的必要条件。为快速检测桔霉素的酶联免疫检测技术的建立和检测试剂盒的研制提供技术依据。

关键词 1,4-丁二醇二缩水甘油醚, 桔霉素, 抗原, 抗体
学科分类号 R392, Q51, Q813

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00525

桔霉素(CIT)是由青霉菌属和曲霉菌属的某些菌株产生的真菌毒素^[1]。桔霉素具有严重的致畸、致癌和诱发基因突变等作用, 人和动物食用含有桔霉素的食物后会造成肝肾损伤^[2]。近年来的调查发现, 许多食品和农产品中都可检测到桔霉素, 在大部分红曲发酵产品中, 桔霉素含量高达欧盟标准的几十到几百倍。桔霉素引起的食品安全问题越来越受到人们的关注。

桔霉素的分析检测方法主要有酶联免疫吸附法(ELISA)^[3]、薄层层析法(TLC)^[4]、高效液相色谱法(HPLC)^[5]和毛细管电泳分析^[6]等。TLC 和 HPLC 是最常用的方法, 但处理繁琐, 检测时间长。

酶联免疫检测法具有特异性强、灵敏度高、检测时间短等特点, 被广泛应用于各种霉菌毒素的检测。目前国内还未见商品化的桔霉素检测试剂盒。桔霉素是小分子质量($M = 250.25$)抗原, 人工合成抗原免疫效果差, 制备抗桔霉素特异性抗体的难度大。

本工作研究了桔霉素-蛋白质偶联抗原的不同合成方法, 免疫小鼠, 获得了抗 CIT 的多克隆抗体, 对抗体的效价和特异性进行了初步鉴定。研究结果为进一步建立桔霉素的酶联免疫检测方法奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

桔霉素(citrinin, CIT), 福氏佐剂购自 Sigma 公司; 牛血清白蛋白(BSA)为 Solarbio 公司产品; 卵清蛋白(OVA)为 Worthington 公司产品; 四甲基联苯胺(TMB)为 TIANGEN 公司产品; HRP 标记羊抗鼠 IgG 购自 Thermo 公司; G-25 凝胶为 Solarbio 公司产品; 1,4-丁二醇二缩水甘油醚(1,4-butanediol diglycidyl ether)为 Alfa Aesar 公司产品。其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 桔霉素-蛋白质偶联抗原的制备方法。

采用双交联法制备 CIT-BSA 偶联抗原^[7]。具体步骤为: 0.5 mg CIT 溶于 0.5 ml 0.6 mol/L NaOH 中, 加入 0.5 ml 2 g/L 硼氢化钠, 再加入 $0.5 \mu\text{l}$ 1,4-丁二醇二缩水甘油醚进行活化, 25°C 振荡 4 h, 加入适量的 Na_2CO_3 使其终浓度为 0.3 mol/L, 加入 5 mg BSA, 37°C 偶联反应 24 h, 反应结束, 加入

* 福建省医疗器械与医药技术重点实验室开放基金资助项目(09003)。

** 通讯联系人。

Tel/Fax: 0591-83720772, E-mail: yanghaoguo@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-09-06, 接受日期: 2009-12-21

过量的甘氨酸, 进行封闭. 将反应产物溶液过 G-25 层析柱进行纯化, 用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 洗脱液洗脱, 收集的第一个洗脱峰即为目标产物 CIT-BSA. 同法制得 CIT-OVA 抗原. 抗原冻干保存.

采用活性酯法^[10]制备 CIT-BSA、CIT-OVA 抗原.

1.2.2 偶联物的表征. 采用 HPLC (1525, Waters) 对 1.2.1 制备的偶联物进行测定, 色谱柱为 G5000PWXL, 流动相 0.01 mol/L PBS, 流速 0.8 ml/min, 检测波长 278 nm 和 319 nm. 采用紫外可见分光光度计 (UV-1800, SHIMADZU) 测定 BSA、CIT 和偶联抗原 CIT-BSA 的紫外吸收曲线. 同时用傅立叶变换红外光谱仪 (SP2000, Perkin-Elme) 进行上述样品的红外光谱分析.

1.2.3 抗血清的制备. 选 8 只 10 周龄 BALB/C 小鼠, 腹腔注射 CIT-BSA 偶联抗原 0.5 ml/只·次 (按 CIT 量为 1.63 μ g/只·次), 每隔 2 周免疫一次, 共免疫 4 次.

1.2.4 抗血清中多克隆抗体效价的测定. 采用间接 ELISA 法测定抗血清中多克隆抗体的效价. 具体方法为: 用包被液按 1:100 稀释抗原 CIT-OVA, 100 μ l/孔, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜; 弃去包被液, 每孔注入 300 μ l PBST 洗液, 重复洗涤 3 次, 拍干酶标板; 加入 5% 脱脂奶溶液, 200 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h; 弃去脱脂奶溶液, 每孔注入 300 μ l PBST 洗液, 重复洗涤 3 次, 拍干酶标板. 按一定比例稀释抗血清, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h; 弃去抗血清, 每孔注入 300 μ l PBST 洗液, 重复洗涤 3 次, 拍干酶标板; 加入酶标二抗, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 弃去酶标二抗, 每孔注入 300 μ l PBST 洗液, 重复洗涤 3 次, 拍干酶标板; 加入底物显色液 TMB, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 15 min; 加入终止液 H₂SO₄, 100 μ l/孔. 用酶标仪 (SH-1000, CORONA) 测定 450 nm 的吸光度值 (A_{450}). 阳性血清 $A_{450} \geq$ 阴性对照孔的 2.1 倍, 并且 A_{450} 大于 0.1, 此时的抗体稀释倍数即是该抗血清的效价.

1.2.5 多抗特异性的鉴定. 采用间接竞争 ELISA 方法鉴定多克隆抗体的特异性. 用 20% 甲醇将 CIT 标准品稀释成不同浓度 (1 000、100、10、1、0.1、0.01 μ g/L) 标准液, 将标准液和适当浓度的抗血清混合, 吸取混合液 100 μ l 按照间接 ELISA 的方法进行测定. 再根据测定结果作进一步的梯度稀释, 稀释到一定浓度范围确定线性区间. 以 $(A/A_0) \times 100\%$ 接近 50% 时混合液中的 CIT 标准浓度作为半

抑制率 IC_{50} .

2 结果与讨论

2.1 桔霉素-蛋白质偶联抗原的合成与表征

2.1.1 HPLC 测定. 本工作分别采用双交联法和活性酯法制备 CIT-BSA 偶联抗原. 对 1.2.1 制备的 CIT-BSA, 采用 HPLC 进行检测, 仅观察到单一吸收峰 (11.867 min), 其出峰时间基本与 BSA (12.047 min) 一致. 未观察到 CIT 吸收峰 (27.581 min), 表明经 G-25 凝胶分离纯化后的偶联物中不含有游离的 CIT.

2.1.2 偶联抗原的紫外光谱分析. BSA、CIT 和偶联抗原 CIT-BSA 的紫外吸收图谱见图 1. BSA 在 278 nm 处有一明显吸收峰, CIT 在 319 nm 有明显的吸收峰, 而偶联抗原的紫外吸收图谱同时出现 2 个特征吸收峰 (278 nm 和 326 nm), 分别对应于 BSA、CIT 的吸收峰, 且有一定的位移, 表明 CIT 与载体蛋白 BSA 发生了偶联反应.

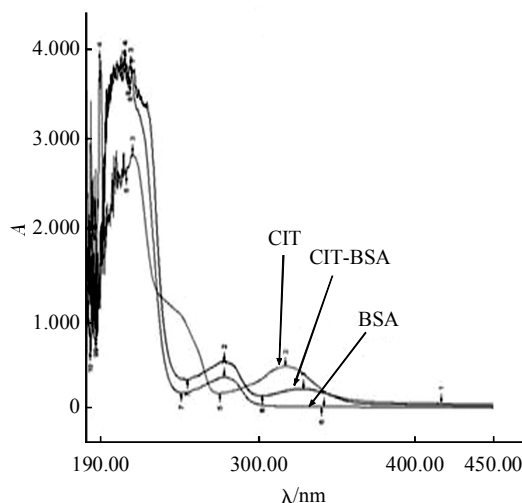


Fig. 1 UV spectrum of CIT, BSA and CIT-BSA conjugate

2.1.3 偶联抗原的红外光谱分析. 图 2a 为 CIT 的红外光谱图, CIT 在 800~1 100 cm^{-1} 区域有一系列的特征吸收峰 (1 019.39 cm^{-1} 、955.53 cm^{-1} 、880.62 cm^{-1}). CIT 的红外光谱图摘自 SDBS: NIMC 有机物谱图库, 日本. 图 2b 为 BSA 红外光谱图, 分别在 1 500~1 700 cm^{-1} 区域以及 2 800~3 400 cm^{-1} 区域存在蛋白质中酰胺基和胺基伸缩的特征吸收峰. CIT-BSA 的红外光谱示于图 2c, 表明 CIT-BSA 除具有上述蛋白质的特征吸收峰外, 在 800~1 100 cm^{-1} 区域出现与 CIT 相类似的特征吸收峰. 说明 CIT-BSA 偶联抗原制备成功.

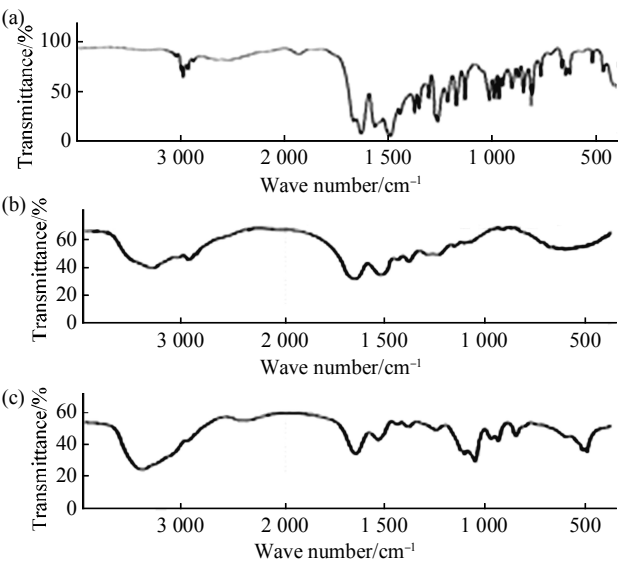


Fig. 2 IR spectrum of CIT, BSA and CIT-BSA conjugate
(a) CIT. (b) BSA. (c) CIT-BSA.

2.1.4 偶联抗原中 CIT/BSA 偶联比的测定.

采用紫外可见分光光度法对偶联抗原中桔霉素与载体蛋白的摩尔比进行测定. 根据所测定的 CIT-BSA 在波长 278 nm 和 319 nm 的吸光度, 以及 CIT 和 BSA 在这两种波长下的摩尔吸光系数, 偶联物的偶联比可按下列公式计算^[8].

$$\frac{C_{\text{CIT}}}{C_{\text{BSA}}} = \frac{A_{280} \times K_{\text{BSA},319} - A_{319} \times K_{\text{BSA},278}}{A_{319} \times K_{\text{CIT},278} - A_{278} \times K_{\text{CIT},319}}$$

其中, $C_{\text{CIT}}/C_{\text{BSA}}$ 为 CIT-BSA 分子中 CIT 与 BSA 的偶联比, A_{278} 、 A_{319} 为其在波长 278 nm 和 319 nm 的吸光度, $K_{\text{BSA},319}$ 、 $K_{\text{BSA},278}$ 、 $K_{\text{CIT},278}$ 和 $K_{\text{CIT},319}$ 为 CIT 和 BSA 在这二种波长下的摩尔吸光系数.

实验结果表明, 所制备的偶联物 CIT-BSA 中 CIT/BSA 的偶联比(摩尔比)为 8.16, 而 CIT-OVA 中 CIT/OVA 的偶联比(摩尔比)为 5.80.

2.2 抗血清效价的测定及免疫进程曲线

用偶联抗原 CIT-BSA 免疫小鼠, 制备抗血清. 采用间接 ELISA 法, 以 CIT-OVA 为检测抗原, 检测抗血清中多克隆抗体的效价. 小鼠的抗血清效价产生曲线见图 3.

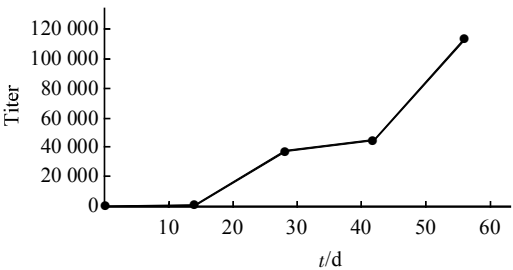


Fig. 3 The titer curve of antibodies

图 3 表明, 随着免疫次数的增加, 小鼠的抗体效价也随之增加, 特别是在免疫 4 次之后抗体效价急剧增加, 达到 1.1×10^5 . 实验数据提示, 本实验所制备的偶联抗原 CIT-BSA 具有良好的免疫原性.

2.3 多克隆抗体的特异性鉴定

采用间接竞争 ELISA 方法测定抗血清中多克隆抗体与桔霉素的竞争抑制曲线. 结果显示, CIT 最低检测浓度为 $10 \mu\text{g/L}$, CIT 浓度在 $10 \sim 250 \mu\text{g/L}$ 有较好的线性关系. 以吸光度比值 A/A_0 为纵坐标, CIT 添加浓度的对数值为横坐标, 拟合标准曲线, 得到线性方程为: $y = -53.492x + 154.07$, $r^2 = 0.9958$. 以吸光度比值 A/A_0 为 50% 时对应的浓度为 IC_{50} , CIT 的 IC_{50} 为 $100 \mu\text{g/L}$ (图 4).

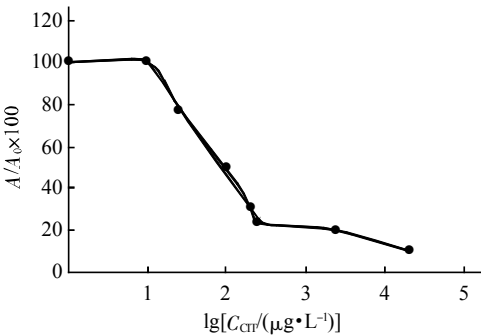


Fig. 4 The competitive inhibition curve of PcAb against CIT

$$y = -53.492x + 154.07, r^2 = 0.9958.$$

偶联抗原不同合成方法的比较见表 1.

Table 1 Comparison of immunogenicity of CIT-BSA prepared by different methods

Method	CIT/BSA	Titer	The CIT-detection limit(μg/L)	IC ₅₀ (μg/L)	Author
The bicoupling method*	8.16	110 000	10	100	Our lab
The active ester method	7.09	36 000	Not detected	Not detected	Our lab
The CDI method**	Not reported	Not reported	Not reported	500	Xiao ^[9]
Mannich Reaction method	19.9	12 500	0.4	3.2	Kononenko ^[3]

*The bicoupling reagent was 1,4-butanediol diglycidyl ether. ** CDI was 1, 1-carbonyldiimidazole.

2.4 偶联抗原不同合成方法的比较

桔霉素的相对分子质量较小($M=250.25$), 属于半抗原, 无免疫原性. 只有将其与大分子载体蛋白偶联, 才能作为免疫原. 因此, 桔霉素-蛋白质偶联抗原的合成是制备高质量抗体, 并进一步建立桔霉素免疫学分析方法的关键性步骤.

桔霉素分子(图 5)存在三个活性基团可以与蛋白质进行偶联, 分别是 C_1 位置的活泼氢、 C_8 位置的羟基和 C_7 位置的羧基. 利用羧基与蛋白质偶联的活性酯法(the active ester method)是最常用的小分子抗原与蛋白质偶联的方法. 本工作采用活性酯法制备的 CIT-BSA 偶联抗原, 免疫小鼠后产生了多克隆抗体, 但未能检测到针对桔霉素的特异性抗体. 桔霉素的羧基可能是桔霉素抗原决定簇中的重要基团, 若将该基团与蛋白质进行偶联, 则改变了桔霉素的抗原性, 无法有效地刺激机体产生针对桔霉素的特异性抗体, 对此刘仁荣等^[9]也有相关报道. 在 CIT 与载体蛋白偶联反应后, 桔霉素抗原决定簇是否被保留是能否刺激机体产生针对桔霉素特异性抗体的关键.

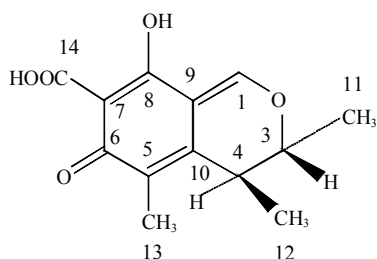


Fig. 5 The structure of citrinin

甲醛加成法(mannich reaction method)利用桔霉素 C_1 位置的活泼氢与蛋白质的一 NH_2 进行偶联反应, 桔霉素抗原决定簇 C_7 位置的羧基以及邻位羟基的保留使 CIT-BSA 抗原具有良好的免疫原性, 可诱导机体产生抗桔霉素的特异性抗体. Kononenko 等^[3]采用甲醛加成法制备 CIT-BSA, 在反应物配比 CIT/BSA 初始摩尔比为 286 的条件下, 获 CIT/BSA 偶联比为 19.9 的偶联物, 免疫后兔抗血清的抗体效价为 12 500, IC_{50} 达到 $3.2 \mu g/L$.

本工作采用双环氧试剂(1, 4- 丁二醇二缩水甘油醚)将桔霉素 C_8 位置的一 OH 与蛋白质的一 NH_2 进行偶联, 化学反应条件温和, 在反应物配比 CIT/BSA 初始摩尔比 30 的条件下, 所获得的偶联物中 CIT/BSA 偶联比达到 8.16. 该偶联抗原具有

良好的免疫原性, 抗体达到较高水平(1.1×10^5), 同时产生针对桔霉素的抗体, 最低 CIT 检测限达到 $10 \mu g/L$, IC_{50} 达到 $100 \mu g/L$. Xiao 等^[9]采用羧基二咪唑作为偶联剂制备 CIT-BSA 偶联物, 也获得了 IC_{50} 为 $500 \mu g/L$ 的实验结果.

实验数据表明, 本工作利用双交联法制备偶联抗原 CIT-BSA, 制备条件温和, 可以获得高质量的抗 CIT 的多克隆抗体, 可作为其他类似小分子物质制备偶联抗原的一种可选方法.

3 结 论

本研究首次以 1, 4- 丁二醇二缩水甘油醚(双环氧试剂)作为偶联剂, 合成偶联抗原 CIT-BSA. 紫外扫描及红外扫描表明其同时具有 CIT 和 BSA 的特征峰. CIT/BSA 的偶联比为 8.16.

制备的 CIT-BSA 偶联抗原具有良好的免疫原性, 抗体效价为 1.1×10^5 , 达到较高的水平. CIT 最低检测浓度为 $10 \mu g/L$, 在 CIT 浓度范围为 $10 \sim 250 \mu g/L$ 有较好的线性关系, CIT 的 IC_{50} 为 $100 \mu g/L$. 这为桔霉素 ELISA 快速检测技术的建立以及检测试剂盒的研制提供了依据.

参 考 文 献

- [1] Blanc P J, Loret M, Goma G. Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotechnology Letters*, 1995, **17**(3): 291
- [2] Vrabcheva T, Usleber E, Dietrich R, *et al.* Cooccurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *J Agricultural and Food Chemistry*, 2000, **48**: 2483-2488
- [3] Kononenko G P, Burkin A A. Immunoenzyme method for the determination of citrinin. *Zhurnal Analiticheskoi Khimii*, 2007, **62**(7): 769-774
- [4] 胡晓清, 陈福生, 邢淑婕, 等. 红曲中桔霉素的薄层层析分析. *食品科学*, 2003, **24**(5): 126-129
Hu X Q, Chen F S, Xing S J, *et al.* *Food Science*, 2003, **24**(5): 126-129
- [5] Franco C M, Fente C A, Vazquez B, *et al.* Simple and sensitive high-performance liquid chromatography-fluorescence method for the determination of citrinin application to the analysis of fungal culture and cheese extracts. *J Chromatography A*, 1996, **723**(1): 69-75
- [6] 陈 军, 李章万, 祁 伟, 等. 高效毛细管电泳分析法检测中药红曲的桔霉素含量. *中国中药杂志*, 2007, **32**(14): 1412-1415
Chen J, Li Z W, Qi W, *et al.* *Chin J Chinese Materia Medica*, 2007, **32**(14): 1412-1415
- [7] 林海英, 黄金钟, 孟 春, 等. 6 型肺炎链球菌荚膜多糖 - 外膜蛋白 A 结合物的表征及免疫原性. *中国新药杂志*, 2007, **16**(24): 2032-2035

- Lin H Y, Huang J Z, Meng C, *et al.* Chin J New Drugs, 2007, **16** (24): 2032–2035
- [8] 刘仁荣, 余 宙, 何庆华, 等. 抗桔青霉素单克隆抗体的研制与鉴定. 卫生研究, 2007, **36**(2): 190–193
- Liu R R, Yu Z, He Q H, *et al.* J Hygiene Research, 2009, **36**(2): 190–193
- [9] Xiao H, Clarke J R, Marquardt R R, *et al.* Improved methods for conjugating selected mycotoxins to carrier proteins and dextran for immunoassays. J Agric Food Chem, 1995, **43**(8): 2092–2097

Preparation of CIT-protein Antigen and Antibody With The Bicoupling Method*

WANG Yuan-Yuan¹⁾, LI Yong-Ning²⁾, GUO Yang-Hao^{1,2)**}

¹⁾ College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China;

²⁾ Fujian Key Laboratory of Medical Devices and Pharmaceutical Technology, Fuzhou 350002, China)

Abstract To prepare Citrinin(CIT)-protein antigen, CIT was conjugated with bovine serum albumin (BSA) by 1,4-butanediol diglycidyl ether. HPLC, UV and IR absorption suggested that CIT was correlated with the carrier protein, and the molar ratio of CIT to BSA was 8.16. The polyclonal antibodies (PcAb) against CIT were produced in serum of immunized BALB/C mice with CIT-BSA, and the titer of antibody reached to 1.1×10^5 by indirect enzyme-linked immunoassay. The indirect competitive ELISA showed that the detection limit of CIT was $10 \mu\text{g/L}$, with a good linearity ranging $10 \sim 250 \mu\text{g/L}$, and IC_{50} was $100 \mu\text{g/L}$. Immunogenicity of antigens prepared by different methods was analyzed. The result showed that the epitope was the carboxyl group at C₇. This work would be helpful for establishing the technology and developing the kit to determine CIT-contaminated samples by ELISA.

Key words 1,4-butanediol diglycidyl ether, citrinin, antigen, antibody

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00525

*This work was supported by a grant from Fujian Key Laboratory of Medical Devices and Pharmaceutical Technology (09003).

**Corresponding author.

Tel/Fax: 86-591-83720772, E-mail: yanghaoguo@yahoo.com.cn

Received: September 6, 2009 Accepted: December 21, 2009