

以赭曲霉毒素 A 单克隆抗体建立竞争酶联免疫吸附分析方法的研究

刘仁荣, 余 宙, 何庆华, 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: 本研究通过活性酯法合成赭曲霉毒素 A 人工抗原, 免疫小鼠制备单克隆抗体, 在此基础上建立了竞争 ELISA 检测方法, 线性范围为 200~6000pg/ml, 检测下限为 150pg/ml。单抗与赭曲霉毒素 B 的交叉反应率为 35%, 与桔霉素、黄曲霉毒素 B₁ 和展青霉素等毒素交叉反应低于 0.01%。在小麦样品中的加标回收率为 83%~116%, 变异系数为 9.4%~19.8%。测试 23 份样品, 赭曲霉毒素 A 的含量在 0.6~2.56μg/kg 之间。

关键词: 赭曲霉毒素 A 人工抗原; 单克隆抗体; 酶联免疫吸附分析方法

Study on Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Ochratoxin A Monoclonal Antibody Determination

LIU Ren-rong, YU Zhou, HE Qing-hua, XU Yang*
(The Key Laboratory of Food Science of MOE, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Ochratoxin A (OTA) artificial antigen was synthesized by active ester method. A monoclonal antibody was prepared after being immune to mice. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay was developed with it. The linear range of the assay was between 200pg/ml and 6000pg/ml and the lowest detectable amount of OTA was 150 pg/ml. Cross reactivity was 35% with ochratoxin B, and less than 0.01% with citrinin, patulin, aflatoxin B₁, deoxynivalenol and zearalenone. Recovery of OTA from wheat spiked with OTA was 83% to 116% and the coefficient of variation was 9.4%~19.8%. The analysis of 23 domestic samples showed OTA levels ranging from 0.6μg/kg to 2.56μg/kg.

Key words: ochratoxin A artificial antigen; monoclonal antibody; ELISA

中图分类号 Q812

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)11-0174-04

赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA) 是曲霉属和青霉属的某些菌株产生的次级代谢产物, 其主要靶器官是肾脏和肝脏, 属烈性的肾脏和肝脏毒素。此外, 赭曲霉毒素 A 还具有致癌、致畸和致突变性。OTA 的产毒菌株广泛地存在于自然界中, 在小麦、玉米、大豆、人血清、人奶等样品中都已检出 OTA^[1,2]。及时进行检测和分析是预防和控制其危害的有效手段。薄层层析法、荧光光度计法、气相色谱法、高效液相色谱法以及质谱联合法等都可用于 OTA 的分析检测。高效液相色谱法等理化分析检测方法可以精确地进行定性和定量分析, 但是由于其设备昂贵、操作复杂和对样品的纯度

有较高的要求, 导致检测成本高、周期长, 无法满足大批量样本快速筛查的需要, 因而使用受到限制。酶联免疫吸附法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 由于其快速、灵敏、可定量、操作简便、无需贵重仪器设备, 且对样品纯度要求不高, 特别适用于大批量样品的检测, 在真菌毒素快速检测领域有着极高的应用价值^[3,4]。国外学者 Kawamura 等 1989 年建立了 ELISA 分析 OTA 的方法, 检测下限可达 50pg/ml^[5]。迄今为止, 我国学者孙蕙兰、阳传和等建立了检测 OTA 的 ELISA 方法, 其检测下限为 2~2.5ng/ml^[6,7], 与国外相比存在一定差距。近年来 OTA 的污染问题引起世界

收稿日期 2004-11-19

*通讯作者

基金项目: “十五” 国家重大科技专项课题 (2002130)

作者简介: 刘仁荣 (1969-), 男, 副研究员, 在读博士, 主要从事食品生物技术方面的研究。

的广泛关注, 欧盟最近对婴儿和儿童食品中的 OTA 的限量标准进行了补充规定, 在包括谷类食物在内的婴幼儿食品以及在具有特殊医疗目的的婴儿食品中, OTA 的最大限量均为 $0.50 \mu\text{g}/\text{kg}$, 使得对检测方法的要求也越来越高。建立更加灵敏高效、具有自主知识产权的检测方法是我们的迫切任务。本研究以活性酯法合成 OTA 人工抗原, 免疫小鼠制备单克隆抗体, 在此基础上建立了间接竞争酶联免疫吸附分析方法(Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), 具有较高的灵敏度和特异性。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A)、匙眼贝血蓝蛋白(Keyhole Limpet Hemocyanin KLH)、牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumen BSA)、二环己基碳化二亚胺(Dicyclohexylcarbodiimide DCC)、氮羟基琥珀酸(N-hydroxysuccinimide NHS)、赭曲霉毒素 B (Ochratoxin B)、桔青霉素(Citrinin, CIT)、展青霉素(Patulin, PAT)、玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEA)、黄曲霉毒素 B₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON) 标品、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG、福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂, 均为 Sigma 产品。

UV-205 紫外分光光度计 日本岛津; TGL-16G 离心机 上海安亭科学仪器 微量移液器 芬兰 Labsystems 公司; K185 紫外透射反射仪、酶标仪 芬兰 Labsystems 公司; 酶标板 Costar。

1.2 实验方法

1.2.1 OTA 人工抗原的制备^[8,9]

OTA 2mg 溶解于 0.5ml 四氢呋喃中, 加入 2mg NHS 和 3mg DCC, 室温反应 24h, 10000r/min 离心 15min 去沉淀, 上清真空干燥得活化产物, 活化产物溶解于 0.5ml 二甲基亚砜(DMSO) 中, 缓慢滴入 KLH 溶液中(15mg 溶于 2ml $0.13 \text{mol}/\text{L}$ NaHCO_3)。室温下振荡反应 4h, 得到 OTA 与 KLH 偶联物 A。同样与 BSA 反应得到 OTA 与 BSA 偶联物 B。反应结束后, $0.01 \text{mol}/\text{L}$ PBS 4°C 透析 72h。偶联产物进行紫外扫描, 根据其在 280nm, 379nm 的吸光值和 OTA 的摩尔消光系数分析测定 OTA 偶联产物的摩尔比。

1.2.2 OTA 单克隆抗体的制备

以 OTA 与 KLH 的偶联物为免疫原, 按常规方法免疫 BALB/c 小鼠, 半固体法筛选单克隆抗体(此项工作由协作单位北京协和医科大学基础医学研究所完成, 论文另外发表)。抗体的纯化采用饱和硫酸铵分级沉淀, 透

析脱盐。

1.2.3 间接竞争酶联免疫吸附分析方法的建立

以 OTA 与 BSA 的偶联物为检测抗原, 4°C 包被过夜, 3% 脱脂牛奶封闭后用 PBST 洗涤 4 次, 加入 PBST 系列稀释的抗体, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 37°C 1h 后, 加入羊抗鼠 IgG: HRP 酶标二抗($100 \mu\text{L}/\text{孔}$); 37°C 作用 1h 后, 洗涤 4 次。联苯二胺(OPD)显色, $2 \text{mol}/\text{L}$ H_2SO_4 终止反应, 测定 492nm 波长光密度(OD 值)。方阵滴定确定的最佳的包被浓度、抗体和酶标二抗工作浓度。

根据确定的最佳的抗原包被浓度、抗体和酶标二抗工作浓度建立 OTA 间接竞争 ELISA 的标准曲线。检测抗原 4°C 包被过夜, 3% 脱脂牛奶封闭。加入不同浓度的赭曲霉毒素 A(溶于 35% 甲醇 PBS) $50 \mu\text{L}$ 和抗体 $50 \mu\text{L}$, 37°C 1h 后, PBST 洗涤 4 次, 加入酶标二抗($100 \mu\text{L}/\text{孔}$); 37°C 作用 1h 后, 洗涤 4 次。联苯二胺(OPD)显色, $2 \text{mol}/\text{L}$ H_2SO_4 终止反应, 测 OD 值, 计算各浓度的结合率, 并作标准曲线。结合率(%) = $B/B_0 \times 100\%$ (B_0 为不加赭曲霉毒素 A 的 OD 值, B 为加赭曲霉毒素 A 的 OD 值)。

1.2.4 单克隆抗体的特异性鉴定

用 35% 甲醇 PBS 溶解不同浓度的 OTB、CIT、PAT、ZEA、AFB₁ 和 DON 标品, 取 $50 \mu\text{L}$ 进行竞争 ELISA 测定, 计算交叉反应率(交叉反应率 = 结合率为 50% 时赭曲霉毒素 A 的浓度 / 结合率为 50% 时近似抗原物质的浓度 $\times 100\%$)。

1.2.5 样品提取实验

在经测定不含赭曲霉毒素 A 的小麦粉中加入不同数量的赭曲霉毒素 A 标品(10、50、100、200、500 和 $1000 \text{ng}/\text{g}$), 用二倍体积的 70% 甲醇提取样品, 涡旋振荡 10min, 5000g 离心 10min 后定性滤纸过滤, 加入同等体积的 PBS 稀释后取 $50 \mu\text{L}$ 进行竞争 ELISA 测定, 计算加标回收率。

1.2.6 样品测定实验

取不同产地及批次的小麦、玉米、大米和饲料样品 23 份, 粉碎后按上述方法提取 OTA 进行测定。

2 结果与分析

2.1 OTA 人工抗原的制备结果

蛋白质与 OTA 的特征吸收峰分别为 280nm 和 379nm, 紫外扫描发现人工抗原出现 OTA 与蛋白质叠加吸收峰, 表明人工抗原的合成成功, 分别测定偶联物在 280 和 379nm 下的 OD 值, 得出人工抗原 A 的偶联摩尔比为 125:1, 人工抗原 B 的偶联摩尔比为 6.8:1(图 1, 2)。

2.2 间接竞争 ELISA 标准曲线

间接竞争 ELISA 标准曲线的检测下限为 $150 \text{pg}/\text{mL}$, 线性范围 $200 \sim 6000 \text{pg}/\text{mL}$, 半量抑制浓度(IC_{50})为

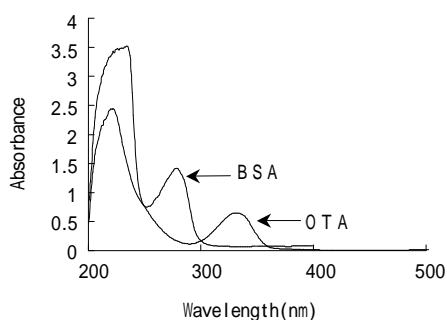


图1 BSA与OTA 标品紫外光谱图
Fig.1 The UV spectrum of BSA and OTA

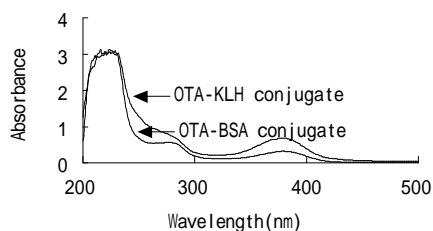


图2 OTA人工抗原紫外光谱图
Fig.2 The UV spectrum of OTA artificial antigen

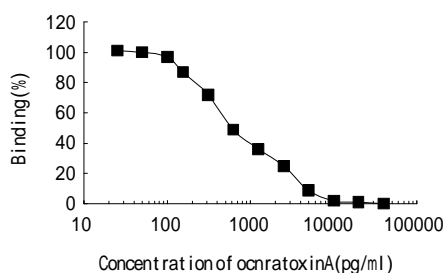


图3 间接竞争ELISA标准曲线
Fig.3 The standard curves of competitive ELISA of OTA

400pg/ml (图3)。

2.3 单克隆抗体的特异性鉴定结果

单克隆抗体与OTB有35%的交叉反应,与CIT、PAT、ZEA、AFB₁和DON基本无交叉反应(表1)。

表1 单克隆抗体的交叉反应率

Table 1 Cross reactivity of monoclonal antibody

OTA Analogous	OTB	CIT	PAT	AFB ₁	ZEA	DON
Crossactivity(%)	35	<0.0	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.4 提取方法验证实验

加入小麦样品中的不同浓度的OTA的回收率为83%~116%,变异系数为9.4%~19.8%(表2)。

2.5 样品分析

共测试了23份样品,OTA的含量在0.6~2.56μg/kg之间(表3)。

3 结论

本实验通过活性酯法制备OTA人工抗原,具有步

表2 赭曲霉毒素A加标回收率

Table 2 Recovery of OTA from wheat spiked with OTA

OTA added (ng/g)	n	Recovery (%)	Coefficient of variation(%)
10	4	116 ± 23	19.8
50	4	97 ± 12	12.3
100	4	103 ± 16	15.5
200	4	95 ± 9	9.4
500	4	88 ± 14	15.9
1000	4	83 ± 11	13.2

表3 不同样品OTA含量的测定结果

Table 3 Results of detecting OTA from different samples

No	Sample	OTA (μg/kg)	No	Sample	OTA (μg/kg)	No	Sample	OTA (μg/kg)
1	rice	0.92±0.10	9	corn	0.86±0.08	17	corn	<0.6
2	rice	<0.6	10	corn	0.65±0.11	18	feedstuff	2.26±0.32
3	rice	<0.6	11	corn	<0.6	19	feedstuff	<0.6
4	wheat	<0.6	12	corn	1.82±0.26	20	feedstuff	0.75±0.11
5	wheat	<0.6	13	corn	<0.6	21	wheat	<0.6
6	wheat	<0.6	14	corn	2.56±0.31	22	wheat	<0.6
7	corn	<0.6	15	corn	<0.6	23	wheat	<0.6
8	corn	<0.6	16	corn	<0.6			

骤简单,副反应少等优点。由于OTA在379nm有特征紫外吸收峰,可根据这一特性测定人工抗原的偶联比并对实验条件进行优化。偶联比对刺激机体产生针对OTA的抗体有较大影响,偶联比太高会导致特异性不好,偶联比太低则抗体产生的滴度不高,都会对单抗的制备带来困难。载体的选择也对免疫效果有直接的影响,一般认为:载体与免疫动物的亲缘关系越远,免疫效果越好。本实验选用KLH作为载体,产生了良好的免疫效果,制备的杂交瘤细胞分泌抗体能力稳定,抗体与其结构类似物及其它毒素的交叉反应低。本研究建立的间接竞争ELISA分析方法检测下限为0.6μg/kg,与Kawamura等建立的分析方法结果相近^[7],具有较高的灵敏度和特异性,样品提取方法简单快速,回收率高,适用于大批量样品的检测,显示良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Blesa J, Berrada H, Soriano JM, et al. Rapid determination of ochratoxin A in cereals and cereal products by liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1046:127-131.
- [2] Nurten Ozcelik, Alim Kos, Demet Soysal. Ochratoxin A in human serum samples collected in Isparta-Turkey from healthy individuals and individuals suffering from different urinary disorders[J]. Toxicology Letters, 2001, 121:19-13.
- [3] Candlish AG, Smith JE, Stimson WH. Monoclonal antibody technology for mycotoxin[J]. Biotech Adv, 1989, (7):401-418.
- [4] Chu FJ. Immunoassays for analysis of mycotoxins[J]. Jour-

气相色谱法测定乳制品中共轭亚油酸的含量

范亚苇, 邓泽元, 李 静

(南昌大学食品科学与工程系, 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘 要: 共轭亚油酸(CLA)作为一种新型的功能性脂肪酸,其主要存在于瘤胃动物的乳和肉的脂肪中。CLA在乳制品中的含量受加工方式、贮藏等多种因素的影响。本文采用毛细管气相色谱法分析不同加工方法的各种乳制品中共轭亚油酸的含量,结果发现经发酵加工的乳制品中共轭亚油酸的含量明显高于未加工的原料乳,被测乳制品中以9c,11t结构的CLA含量为主,加工后的乳制品其反式CLA的含量都有所增加。

关键词: 共轭亚油酸; 乳制品; 气相色谱法

Analysis of Conjugated Linoleic Acids Content in Dairy Products by Gas Chromatography

FAN Ya-wei, DENG Ze-yuan, LI Jing

(Department of Food Science and Engineering, Nanchang University,
The Key Laboratory of Food Science, Ministry of Education, Nanchang 330047, China)

Abstract: Conjugated Linoleic Acid (CLA) was a new functional fatty acid, mainly existed in milk fat and meat fat of ruminant animals. CLA content in dairy products was affected by the processing conditions, storage and others. The fatty acid composition and content in the various dairy products were analyzed with capillary gas chromatography. The results indicated that the CLA content of the starter-cultured dairy products was relatively higher than that of the raw milk. The major isomer of the CLA in the samples was 9c,11t-CLA. Thus the trans-isomer CLA increased in the processed dairy products.

Key words: CLA; dairy products; gas chromatography

中图分类号 TS252.7

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)11-0177-03

共轭亚油酸(Conjugated Linoleic Acid, CLA)是亚油酸异构体混合物的总称,其共轭双键以顺式或反式结构存在。研究表明CLA有抗癌、抗动脉粥样硬化,提高免疫减少脂肪沉积等方面的功能,其具有生物活性的异构体主要以9c,11t-CLA和10t,12c-CLA的形

式存在^[1]。

共轭亚油酸广泛分布在许多食品中,天然的CLA主要存在于瘤胃动物牛、羊等的乳及肉制品脂肪中。牛奶是最丰富的天然CLA来源,平均每克牛奶的脂肪中CLA含量从2~37mg不等^[2]。CLA在食品中的含量高低

收稿日期: 2005-06-08

基金项目: 国家自然科学基金(30460117); 江西省教育厅重点项目(2004013)

作者简介: 范亚苇(1969-),女,讲师,在读博士,主要从事食品化学与功能食品研究。

nal of Food Protection, 1984, (47):562-564.

[5] Kawamura O Sato, Kaj I I S, et al. A sensitive enzyme-linked immunoassay of ochratoxin A based on monoclonal antibodies [J]. Toxicon, 1989, 27(8):887-897.

[6] 孙蕙兰, 牛相钟, 朱瑞元. 抗赭曲霉毒素A抗体的制备与鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 1991, 22(3): 235-237.

[7] 阳传和, 罗雪云, 李业鹏, 等. 抗赭曲霉毒素A单克隆体

杂交瘤细胞系的建立及特性[J]. 单克隆抗体通讯, 1992, 8(2):17-21.

[8] 陈雪岚, 许杨, 熊勇华. 中国大耳白兔与罗曼母鸡赭曲霉毒素A抗原免疫应答性的研究[J]. 卫生研究, 2003, 32(1): 24-25.

[9] 陈雪岚, 许杨, 吴成钢. 赭曲霉毒素A的酶联免疫检测--抗原的制备[J]. 卫生研究, 2002, 31(1):53-54.