

技术与方法

圆弧青霉菌毒素-青霉酸人工抗原的合成与鉴定

雷红宇, 袁慧, 邬静, 袁莉芸, 文利新, 倪姮佳

湖南农业大学动物医学院, 长沙 410128

摘要: 为建立圆弧青霉菌毒素-青霉酸的免疫学检测方法, 研究了青霉酸(PA)的人工抗原合成。通过碳二亚胺法将青霉酸(PA)分别与牛血清白蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)联结, 得到青霉酸人工抗原 PA-BSA 和 PA-OVA。采用紫外扫描光谱法、SDS-PAGE 和动物免疫试验对合成的抗原进行鉴定。结果显示联结后的人工抗原特征性吸收峰出现偏移, PA 与 BSA 的偶联比为 23.2:1, PA 与 OVA 的偶联比为 10.4:1。以 PA-BSA 为免疫抗原免疫小鼠, PA-OVA 为包被抗原, 采用间接 ELISA 检测抗血清, 其效价达到 1:12 800。表明青霉酸的人工抗原已合成, 为建立有效的免疫检测方法提供了基础。

关键词: 青霉酸, 人工抗原, 合成, ELISA

Synthesis and Identification of Penicillic-Acid Antigens from *Penicillium cyclopium*

Hongyu Lei, Hui Yuan, Jing Wu, Liyun Yuan, Lixin Wen, and Hengjia Ni

College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Abstract: To establish a new immune assay for Penicillic Acid (PA) from *Penicillium cyclopium*, we studied the synthesis of conjugated complete antigens for penicillic acid. PA was conjugated to bovine serum album (BSA) and ovalbumin (OVA) by 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC). The artificial antigens PA-BSA and PA-OVA were identified by ultraviolet spectrometric scanning, SDS-PAGE and immunization. Results showed that the absorption peak of conjugation were different from that of the carrier protein alone and of the PA. The conjugated ratio of PA and BSA was 23.2:1 and that of PA and OVA was 10.4:1. Balb/c mice were immunized by the artificial antigen of PA-BSA, with PA-OVA as coating antigen. The average titer of antisera was more than 12 800 by indirect ELISA. The obtained antigens offered a basis for developing immunoassay method.

Keywords: penicillic acid (PA), artificial antigen, synthesis, ELISA

青霉酸(Penicillic acid, PA)是圆弧青霉菌有毒代谢产物的主要成分, 自 1931 年由 Alsbrg 和 Black 首次从侵染软毛青霉的玉米中分离出后, 到现在查明有曲霉属、青霉属和瓶梗青霉属共 28 种真菌能产生青霉酸, 是饲料中含量较高的真菌毒素之一^[1-3]。青霉酸属于内酯类毒素(分子结构式见图 1), 可以异构

形成一种取代的酮酸, 分子量为 170.16, 易溶于热水、乙醇、乙醚和氯仿。国内外许多研究表明, 青霉酸对各种动物均具有毒性, 能引起心脏、肝脏和肾脏等多脏器的损伤, 并且是一种潜在的致癌物^[4-6]。另外, 青霉酸能与其他霉菌毒素产生联合毒性, 若与其它霉菌毒素共同作用能增强其毒性^[7-11]。

Received: September 19, 2007; **Accepted:** November 8, 2007

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 30671548).

Corresponding author: Hui Yuan. Tel: +86-73-14613712; E-mail: yuanhui7269@yahoo.com.cn

国家自然科学基金项目(No. 30671548)资助。

鉴于青霉酸对动物和人类健康都构成了严重的威胁, 需要研究出快速而有效的检测方法。

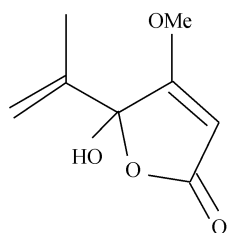


图 1 青霉酸的结构式

Fig. 1 The structure of Penicillic Acid

免疫分析方法具有特异性强、灵敏度高、操作简便、检测快速等优势, 近年来在霉菌毒素检测领域逐渐引起关注, 并对此展开了广泛和深入的研究。免疫分析是以抗体与相应抗原及半抗原发生自发的、高选择性的特异性为基础的分析技术, 其最为关键的环节是获得高效的特异性抗体, 而大部分霉菌毒素的分子量小, 不能单独刺激机体产生抗体, 因此霉菌毒素人工合成完全抗原是目前霉菌毒素免疫检测研究的难点问题, 同时也是免疫检测技术的关键环节^[12]。本文采用水溶性碳二亚胺(EDC)作为偶联剂, 合成了青霉酸的完全抗原, 并通过动物免疫实验检测, 为进一步制备青霉酸单克隆抗体提供了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

牛血清白蛋白 BSA (Sigma)、青霉酸(Iris Biotech GmbH)、水溶性碳化二亚胺 EDC (Sigma), 卵清蛋白 OVA(Sigma)、考马斯亮蓝(Sigma)、弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂(Gibco)、HRP 酶标兔抗鼠(Sigma)、透析袋(solarbio)、紫外可见分光光度计(Unico-3802)、酶标仪(AT-858)、96 孔酶标板(Greiner 655001)、微量移液器(Gilson)、Balb/c 小鼠 12 只(清洁级)。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫抗原 PA-BSA 的合成

采用碳二亚胺法将青霉酸(PA)与牛血清白蛋白(BSA)偶联。取 2 g PA, 23 g EDC, 9.2 mg NHS, 充分溶解于 1 mL DMF 中, 4℃ 搅拌反应 6 h。取 6.5 mg BSA 溶解于 2.0 mL 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(PBS, pH 7.4)中, 缓慢加入反应液中, 边加边摇晃, 室温避光

反应 12 h。将反应产物用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(PBS, pH 7.4)在 4℃ 下透析 72 h, 第一天每 4 h 换透析液一次, 以后每 12 h 换透析液一次。分装后于 -20℃ 保存。

1.2.2 检测抗原 PA-OVA 的合成

同样采取碳二亚胺法将青霉酸与卵清蛋白(OVA)偶联, 以 17 mg OVA 取代 BSA, 其他步骤同 1.2.1。

1.2.3 紫外扫描光谱鉴定抗原

用 PBS 将 BSA、OVA 和两种偶联产物 PA-BSA、PA-OVA 稀释到一定浓度, 分别进行紫外全波长扫描, 观察紫外吸收光谱图, 并对其光谱进行分析, 粗略估计其偶联比。偶联比的计算公式为: $C_{PA}/C_{BSA} = (D_{PA-BSA, 237nm} \times K_{BSA, 279nm} - D_{PA-BSA, 279nm} \times K_{BSA, 237nm}) / (D_{PA-BSA, 279nm} \times K_{PA, 237nm} - D_{PA-BSA, 237nm} \times K_{PA, 279nm})$ 和 $C_{PA}/C_{OVA} = (D_{PA-OVA, 237nm} \times K_{OVA, 278nm} - D_{PA-OVA, 278nm} \times K_{OVA, 237nm}) / (D_{PA-OVA, 278nm} \times K_{PA, 237nm} - D_{PA-OVA, 237nm} \times K_{PA, 278nm})$, 其中 D 为指定波长下指定物质的吸光值, K 为指定波长下指定物质的摩尔吸光系数^[13]。

1.2.4 SDS-PAGE 鉴定抗原

SDS-PAGE 所用浓缩胶浓度为 5%、分离胶浓度为 12%、浓缩电压为 80V、分离电压 120V, 电泳完毕后用考马斯亮蓝染色剂染色 5 h, 脱色液脱色至背景为白色为止。蛋白电泳图通过凝胶成像系统并进行分析。

1.2.5 动物免疫

选用 12 只 8 周龄 Balb/c 小鼠进行动物免疫, 免疫原为 PA-BSA, 每次免疫剂量为 100 μg/只, 腹腔注射, 每 2 周免疫 1 次。初次免疫采用弗氏完全佐剂乳化完全抗原, 加强免疫采用弗氏不完全佐剂乳化完全抗原。免疫后 7 d 后断尾采血, 离心收集血清, 4℃ 保存备用。

1.2.6 抗血清效价的检测

采用间接 ELISA (酶联免疫吸附试验) 测定抗血清和包被抗原的反应性能。用包被液将 PA-OVA 适当稀释, 按每孔 100 μL/孔包被酶标板, 37℃ 温育 1 h, 倒出孔内液体, 用洗涤液洗涤 3 次。加封闭液 100 μL/孔, 37℃ 温育 1 h, 倒出孔内液体, 洗涤 3 次。待检血清样品倍比稀释后, 100 μL/孔, 37℃ 温育 1 h, 洗涤 3 次。酶标二抗最适工作浓度稀释后 100 μL/

孔, 37°C 温育 1 h, 洗涤 3 次。加入新鲜配制的底物溶液 100 μL /孔, 避光静置 10 min, 加终止液 50 μL /孔, 采用酶标仪测定 450 nm 处 OD 值。当 OD 值大于或等于阴性对照 OD 值 2 倍时的最高血清稀释倍数为血清效价。

2 结果与分析

2.1 抗原的紫外扫描结果

紫外扫描结果显示, 青霉素在 237 nm 处有最大吸收峰, BSA 在 279 nm 处有最大吸收峰, OVA 278 nm 处有最大吸收峰。由图 2 可见, 全抗原 PA-BSA 在 216 nm 处存在肽链的强吸收峰, 而载体蛋白 BSA 原在 279 nm 处的特征吸收峰向 237 nm 方向偏移, 移至 276 nm 处, 且峰值明显减小, 可以初步判断在载体蛋白 BSA 上连接了 PA, 但由于青霉素分子量较小, 因此偏移不大。

由图 3 可见, PA-OVA 在 210 nm 处存在肽链的强吸收峰, 载体蛋白 OVA 原在 278 nm 处的特征吸收峰移至 274 nm 处, 且峰值明显减小, 可以判断在载体蛋白 OVA 上连接了 PA。

2.2 SDS-PAGE 结果

人工抗原及其载体的 SDS-PAGE 结果显示, 合成的人工抗原稍有拖尾现象, 但与载体蛋白没有明显差异(见图 4), 可以表明人工抗原分子量比其相应载体的分子质量略大。

2.3 偶联比的计算结果

利用分光光度计测量半抗原 PA、BSA 和 OVA 的在 237 nm 与 279 nm、278 nm 处的吸光值, 根据公式计算出 PA-BSA 中半抗原与 BSA 的偶联比

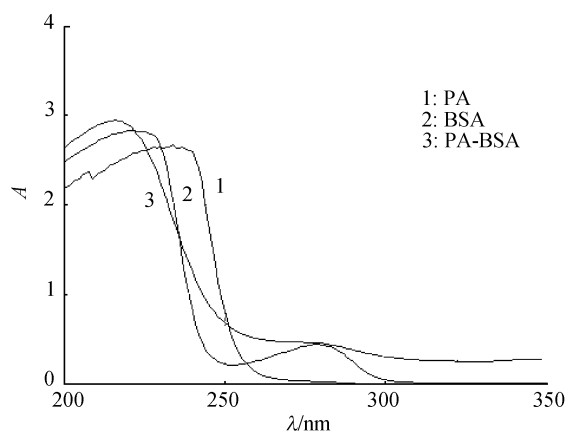


图 2 PA、BSA 及免疫抗原 PA-BSA 的紫外扫描光谱
Fig. 2 The ultraviolet scan of BSA-PA, BSA and PA

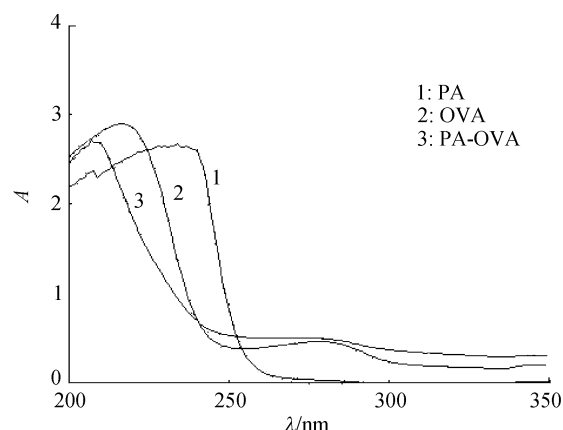


图 3 PA、OVA 及检测抗原 PA-OVA 的紫外扫描光谱
Fig. 3 The ultraviolet scan of OVA-PA, OVA and PA

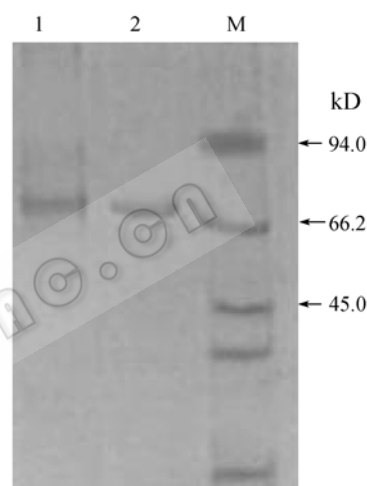


图 4 合成抗原的 SDS-PAGE 图谱
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of BSA-PA
1: BSA-PA; 2: BSA; M: Standard protein marker

为 23.2:1, 偶联物浓度为 3.29 mg/mL; PA-OVA 中半抗原与 OVA 的偶联比为 10.4:1, 偶联物浓度为 2.68 mg/mL。结果见表 1。

2.4 动物免疫试验结果

第四次免疫 7 d 后小鼠断尾采血, 采用间接 ELISA 测定抗血清的效价。由表 2 和图 5 可见用酶标仪在 450 nm 下检测的平均血清效价高达 1:12800, 表明用本试验制备的免疫抗原来免疫小鼠, 能够产生特异性抗体。

3 讨论

青霉素属于小分子物质, 没有免疫原性, 不能直接刺激机体产生特异性抗体, 必须与载体蛋白偶联后才具有免疫原性。目前常用的载体蛋白有牛血

表 1 半抗原与载体蛋白浓度、吸光值及偶联比
Table 1 The substitution degree, absorbance and concentration of half-antigen and carrier proteins and conjugates

Sample	Concentration/(mg/mL)	A _{237 nm}	A _{279 nm}	A _{278 nm}	Couple ratio
PA	0.2	2.6481	0.0214	0.0231	—
BSA	0.21	1.3645	0.4379	0.4377	—
OVA	0.21	0.9826	0.4525	0.4543	—
PA-BSA	3.29	1.5269	0.4532	0.4559	23.2:1
PA-OVA	2.68	0.7991	0.4853	0.4910	10.4:1

表 2 抗血清效价的检测结果(平均 OD_{450nm} 值)
Table 2 The antiserum titers results(average OD_{450 nm})

Dilutive multiple	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12 800	1:25 600	Negative serum
OD	2.133	1.815	1.574	1.137	0.834	0.570	0.316	0.162

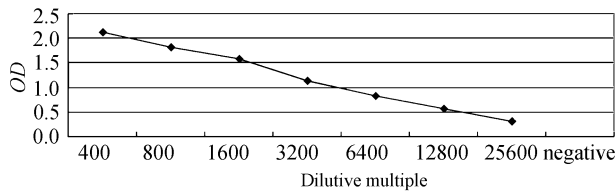


图 5 抗血清效价的检测结果(平均 OD_{450 nm} 值)
Fig. 5 The antiserum titers results (average OD_{450 nm})

清蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白等，从半抗原与载体发生偶联难易程度来看，牛血清蛋白中赖氨酸含量高，应更容易与半抗原结合^[14,15]。本试验采用碳二亚胺法将青霉酸与载体蛋白联结合成人工抗原，通过紫外扫描分析对其进行鉴定，结果表明偶联物的特征峰与 PA 和载体蛋白相比都出现偏移，初步表明连接成功。两种偶联物的光谱图中都出现肽链强吸收峰左移，279 nm 或 278 nm 特征吸收峰也左移，且峰值明显减少。这可能与青霉酸与载体蛋白结合后对其结构有影响，从而出现变化，还有待进一步研究确证。

蛋白载体分子上半抗原偶联数目的多少对抗体的生成有较大的影响，许多研究认为结合比在 1:5~1:25 之间为宜，过多或过少都可能导致动物免疫系统耐受，或不足以激发动物的免疫应答而不能获得满意的抗体^[16-18]。本试验中合成的青霉酸免疫抗原和包被抗原的偶联比分别为 23.2:1 和 10.4:1，正在这个范围之内，说明可能有较好的免疫效果，动物免疫后特异性抗体的产生也证明了这一点。

载体的选择对免疫效果也有直接的关系，一般认为载体与免疫动物的亲缘关系越远，免疫效果越好。本试验用 BSA 为载体蛋白免疫动物，用

PA-OVA 为包被抗原，可以消除抗血清中交叉免疫的影响。间接 ELISA 结果表明，小鼠免疫后产生了较强的免疫应答，8 周后抗体效价达到 1:12 800。青霉酸免疫抗原与检测抗原的合成成功为下一步制备抗青霉酸的单克隆抗体及其检测试剂盒的研究奠定了基础。

REFERENCES

[1] Wang SX. Veterinary Mycology. Yang ling: Northwest Agricultural and Forestall University Press, 2005.
汪昭贤. 兽医真菌学. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2005.

[2] Yuan H, Xiang JZ. The contaminative quantity of penicillium toxin in animal feeds of different period and species. *Hunan Feed*, 2000, (2): 8-9.
袁慧, 向建洲. 不同时期不同品种的饲料中青霉菌毒素的污染量. 湖南饲料, 2000, (2): 8-9.

[3] Yuan H, Deng FX. Investigation of penicillium toxin in mould feeds in Hunan province. *Hunan Feed*, 1998, (5): 22-23.
袁慧, 邓芳席. 湖南省霉变饲料中青霉菌毒素的实验调查. 湖南饲料, 1998, (5): 22-23.

[4] Sorenson WG, Simpson J. Toxicity of penicillic acid for rat alveolar macrophages *in vitro*. *Environ Res*, 1986, 41(2): 505-513.

[5] Pandiyan V, Nayeem M, Nanjappan K, *et al*. Penicillic acid as Na⁺,K⁺ and Ca²⁺ channel blocker in isolated frog's heart at toxic levels. *Indian J Exp Biol*, 1990, 28(3): 295-296.

[6] Kimmel JL, Tipton PA. Inactivation of GDP-mannose dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* by penicillic acid identifies a critical active site loop. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 441(2): 132-140.

[7] Stetina R. Induction of DNA single-strand breaks and DNA synthesis inhibition in CHO and AWRP cells after

- exposure to sterigmatocystin and penicillic acid. *Folia Biol (Praha)*, 1986, **32**(6): 406–413.
- [8] Stoev SD, Vitanov S, Anguelov G, *et al.* Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a diet containing ochratoxin A and penicillic acid. *Veterinary Research Communications*, 2001, **25**(3): 205–223.
- [9] Keblys M, Bernhoft A, Hofer CC, *et al.* The effects of the penicillium mycotoxins citrinin, cyclopiazonic acid, ochratoxin A, patulin, penicillic acid, and roquefortine C on *in vitro* proliferation of porcine lymphocytes. *Mycopathologia*, 2004, **158**(3): 317–324.
- [10] Grabsch C, Wichmann G, Loffhagen N, *et al.* Cytotoxicity assessment of gliotoxin and penicillic acid in *Tetrahymena pyriformis*. *Environ Toxicol*, 2006, **21**(2): 111–117.
- [11] Li YS, Zhou Y, Tan JH. Development of detection methods of mycotoxin. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2006, **16**(1): 126–128.
李岩松, 周玉, 谭建华. 真菌毒素快速分析方法研究进展. 中国卫生检验杂志, 2006, **16**(1): 126–128.
- [12] Hu LG, Hu SY, Wei PH, *et al.* The Techniques of Enzyme and Immunization Assay. Nan jing: Nanjing University Press, 1998.
胡利国, 胡少永, 魏平华, 等. 酶免疫测定技术. 南京: 南京大学出版社, 1998.
- [13] Chen XL, Xu Y, Wu CG. Determination of ochratoxin A by ELISA - I. Study on the preparation of ochratoxin A antigen. *Journal of Hygiene Research*, 2002, **31**(1): 53–55.
- 陈雪岚, 许杨, 吴成钢. 赭曲霉毒素 A 的酶联免疫检测-I 抗原的制备. 卫生研究, 2002, **31**(1): 53–55.
- [14] Liu Y, Liu XJ, Xu XY, *et al.* Synthesis of artificial antigen and preparation of polyclonal antibodies against zearanol. *Journal of Analytical Science*, 2006, **22**(1): 1–4.
刘媛, 刘贤进, 余向阳, 等. 玉米赤霉醇人工抗原合成及其多克隆抗体的制备. 分析科学学报, 2006, **22**(1): 1–4.
- [15] Jiang H, Xiong YH, Xu Y, *et al.* Preparation of aflatoxin B1 artificial antigen by EDC method. *Food Science*, 2005, **26**(7): 125–128.
江湖, 熊勇华, 许杨, 等. EDC 法制备黄曲霉毒素 B1 人工抗原的研究. 食品科学, 2005, **26**(7): 125–128.
- [16] Liu RR, Yu Z, He QH, *et al.* Study on competitive enzyme-linked immunosorbent assay for ochratoxin in a monoclonal antibody determination. *Food Science*, 2005, **26**(11): 174–177.
刘仁荣, 余宙, 何庆华, 等. 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. 食品科学, 2005, **26**(11): 174–177.
- [17] Cao YH, Meng XQ, Feng J, *et al.* Preparation of T-2 toxin antigen and determination by ELISA. *Chinese Journal of Endemiology*, 2003, **22**(5): 453–455.
曹艳红, 孟宪清, 冯杰, 等. T-2 毒素抗原的制备与 ELISA 法检定. 中国地方病学杂志, 2003, **22**(5): 453–455.

测试与测量领域的科技盛宴——首届安捷伦科技节在京隆重开幕

中国北京 2008 年 4 月 24 日讯—安捷伦科技有限公司(NYSE:A)于今天宣布, 为期两天的首届安捷伦科技节于今日在北京安捷伦科技中国总部大厦拉开序幕。此次科技节是中国测试与测量领域的一场科技盛宴, 共吸引了来自测试测量领域的知名专家、学者、政府部门的主管、行业代表以及高等院校的大学生共 500 多人。“安捷伦科技节”是安捷伦对中国的长期承诺、积极推动本土科技和创新发展的又一力证。

在主题为“安捷伦与奥运会”、“安捷伦与中国”和“安捷伦与未来科技”的科技节上, 安捷伦举办了一系列讲座和论坛, 其中包括“未来测量科技”、“食品安全技术”和“反兴奋剂技术”等话题。同时“安捷伦中国创新成就展”和“安捷伦中国历史回顾图片展”也在科技节上呈现。“安捷伦奥运会兴奋剂检测历史展”首次亮相, 向公众展示安捷伦自 1972 年奥运会至今为历届奥运会兴奋剂检测方面作出的贡献。安捷伦科技中国总部大厦内世界级的开放实验室也全天开放。科技节期间, 配备安捷伦最新设备的“移动水质检测车”也在安捷伦科技大厦的园区内流动展示, 并邀请参观者参与现场互动实验。

安捷伦科技公司(NYSE:A)是世界著名的测量公司及通信、电子、生命科学和化学分析领域的技术领导者, 公司现有员工 19,100 人, 为 110 多个国家的客户服务。如需与安捷伦有关的更多信息, 请访问网址: www.agilent.com

安捷伦科技是 1999 年美国惠普公司战略重组后成立的一家跨国高科技公司。1985 年成立的中国惠普/安捷伦是中国第一家高科技合资企业。迄今为止, 安捷伦在中国拥有 1500 多名员工, 其中包括 500 人的研发团队; 在中国 14 个城市设有六家子公司和 20 个办事处, 业务涉及软件和硬件研发、制造、市场推广、销售和售后服务支持。