# 展青霉素多克隆抗体的制备

刘冰，张富源，高进，生威，王硕
（天津科技大学新农村发展研究院，天津 300457）

**摘要：**展青霉素是一种神经毒素，对动物的细胞和组织有很强的毒性作用。展青霉素原药毒性大，价格昂贵且不稳定；其化学结构简单，直接制备免疫原效果不理想。因此，目前报道的展青霉素免疫分析方法并不多。免疫原的设计合成是免疫分析方法建立的关键步骤之一。本论文通过计算机辅助模拟设计，借鉴药物分子虚拟筛选的方法，研究展青霉素结构特点，优化筛选毒性较低且价格廉价的替代物，设计并成功合成展青霉素半抗原。活化酯法偶联两种载体蛋白（BSA 和 KLH）制备展青霉素两种免疫原，免疫动物制备多克隆抗体，抗血清效价分别可以达到 1:16000 和 1:64000。本研究为进一步建立展青霉素免疫分析方法打下基础。同时，论文为小分子有毒有害物免疫原设计提供了一种新思路和新方法。

**关键词：**展青霉素；分子模拟；半抗原；多克隆抗体
**文章篇号：**1673-9078(2017)9-171-175 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.025

# Preparation of Polyclonal Antibodies for Patulin

**LIU Bing, ZHANG Fu-yuan, GAO Jin, SHENG Wei, WANG Shuo**
(Tianjin University of Science and Technology, Institute for New Rural Development, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Patulin is a neurotoxin with a strong toxic effect. This toxin is expensive and unstable; the chemical structure of patulin is simple, and the direct preparation of immunogens from patulin has a poor immune effect. As a result, few immunoassay methods for patulin have been reported. Design and preparation of the immunogen is one of the key steps for developing the immunoassay. Here, the structural characteristics of patulin were studied via computer-aided simulation design and methods for virtual screening of drug molecules. A suitable substitute with low toxicity and cost was optimized and screened, and the hapten of patulin was designed and successfully prepared. Two immunogens of patulin were obtained by conjugation with two carrier proteins (BSA and KLH) by the active ester method. The polyclonal antibodies were prepared after the immunization of rabbits, and the antiserum titers reached 1:16000 and 1:64000, respectively. This study lays a foundation for the further establishment of an immunoassay for patulin and also provides new ideas and methods for designing immunogens for toxic small-molecule compounds.

**Key words:** patulin; molecular modeling; hapten; polyclonal antibodies

展青霉素（patulin，PAT）又称棒曲霉素，是由曲霉和青霉等真菌产生的一种次级代谢产物，具有广谱的抗生素特点。展青霉素是一种神经毒素，对动物的细胞和组织有很强的毒性作用。毒理学试验表明，展青霉素具有致癌、致突变和胚胎毒性，高剂量的展青霉素还有免疫抑制作用[1,2]。绝大多数水果含水量 80%以上，在储藏、运输和零售过程中非常容易引起腐烂；而展青霉素普遍存在于腐烂变质的苹果、梨和山楂等水果中。我国GB 2761-2005《食品中真菌毒素限量》中规定苹果、山楂半成品限量标准为 100 μg/kg，果汁、果酱、果酒、罐头和果脯的限量标准为 50 μg/kg。相对于中国，欧洲国家的要求更为严格，PAT限量标准值域定为 0~50 μg/kg；国际世贸组织推荐 PAT 在苹果汁中的最高检出水平为 50 μg/kg，但许多国家仍将果汁中 PAT 残存量维持调节在 20~50 μg/L。世界各国也越来越重视展青霉素对人类健康的影响，对其在食品中的污染情况开展了大量的调查研究[3~5]。因此，建立快速有效的方法检测其残留量对于保护消费者健康具有重要的意义。

免疫分析方法专一性高、特异性强、价格低廉、能够满足快速检测的需要，因此受到很多科学家的关注[6~9]。免疫分析方法建立过程中，半抗原的设计合成直接影响到特异性抗体的产生，因此合理的半抗原设计尤为重要[10,11]。1993 年首次报道抗展青霉素多克隆抗体的制备，利用展青霉素结构上羟基进行衍生化制备半抗原，免疫小鼠后抗体效价并不理想[12]。随后 De Champdore 小组获得高效价抗展青霉素抗体，建立其荧光偏振免疫检测方法，方法检出限达到 50

收稿日期：2017-03-16
基金项目：天津科技大学新农村发展研究院开放基金资助项目（XNC201506）
作者简介：刘冰（1979-），女，博士，副教授，研究方向：食品安全检测
通讯作者：王硕（1969-），男，博士，教授，研究方向：食品安全检测

μg/mL[13]。山东农业大学硕士以 L-阿拉伯糖为初始物通过 5 步反应制备半抗原，步骤繁琐，由于没有脱去保护基团，并没有获得高特异性抗体[14]。目前已报道的展青霉素免疫分析方法并不多，主要由于展青霉素毒性大且化学结构简单，不易引起免疫应答。近年来研究者将分子模拟方法引入到小分子半抗原的合理设计中，通过比较抗原决定簇区域与待分析物的空间结构及电子模型等物理化学参数来进行半抗原设计，可提供更加合理的设计方案[15]。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂药品与仪器设备

#### 1.1.1 试剂药品

3-羟基-6-甲基-2H-四[3,2-C]吡喃-4-酮；琥珀酸酐、N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）、碳二亚胺（EDC）、牛血清白蛋白（BSA）和匙孔血蓝蛋白（KLH）均购自美国 Sigma 公司；磷酸氢二钠、磷酸氢二钠、N,N-二甲基甲酰胺、吡啶、氯仿、乙酸乙酯、石油醚和无水硫酸钠均购于国药集团化学试剂有限公司。

#### 1.1.2 主要仪器设备

Hyper Chem Release 8.0 软件下载于华军软件园；分析天平德国 Sartorius 公司；加热磁力搅拌器美国 IKA 公司；涡旋混合器北方同正公司；紫外可见分光光度计美国 Varian 公司；高效液相色谱系统日本 Shimadzu（岛津）公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 展青霉素结构类似物的优化筛选

结构类似物筛选：在 chemical Book 中输入展青霉素化学结构，按照结构相似度 60%进行搜索，选择与展青霉素结构类似的化合物。

分子叠合：运用 Hyper Chem Release 8.0 软件构建分子结构，选择半经验算法中 CNDO 方法对展青霉素及结构类似物进行分子结构优化，然后对六个化合物进行两两分子叠合。

静电势构建：优化好的展青霉素、结构类似物及半抗原，添加分子表面，调整透明度，构建静电势表面。

#### 1.2.2 展青霉素半抗原（PATH）的合成及表征

琥珀酸酐法合成展青霉素类似物的半抗原（PATH）。称取 414.68 mg 展青霉素结构类似物放于圆底烧瓶中，加入 348.4 mg 琥珀酸酐，溶解于 6 mL 无水吡啶；60 ℃油浴反应 9 h。旋蒸除去吡啶，得到油状粗产物。加入 4 ℃预冷过的氯仿和冰水萃取，收集有机相；无水硫酸钠干燥过夜后，过滤除去硫酸钠，滤液减压除去氯仿，真空干燥得到黄色粉末。选用乙酸乙酯和石油醚作为展开剂（石油醚:乙酸乙酯=1:1），柱层析进行分离纯化；展开后组分的移动程度常用比较移值 $R_f$ 表示。纯化后取产物 5 mg 用色谱甲醇作为溶剂，0.45 有机膜过滤后，采用质谱鉴定。

#### 1.2.3 展青霉素免疫原（PATH-BSA，PATH-KLH）的制备及表征

PATH-BSA 的制备：称取 4.06 mg 半抗原溶于 200 μL DMF 中，然后依次加入 12 mg EDC、7 mg NHS，室温避光搅拌反应 16 h，得到活化酯。取 30 mg BSA 溶于 6 mL PBS 中，将上述活化酯缓慢滴加到 BSA 溶液中，4 ℃搅拌反应过夜，移入透析袋，4 ℃于 0.01 mol/L PBS (pH 7.4)中透析 3 d，每天更换 3 次透析液，取出后计算浓度，于-20 ℃冰箱储存备用。

PATH-KLH 的制备：称取 10 mg 半抗原溶于 1 mL DMF 中，然后依次加入 17.68 mg EDC 和 10.6 mg NHS，室温避光搅拌反应 16 h，得到活化酯。取 15 mg KLH 溶于 3 mL PBS 中，将上述活化酯缓慢滴加到 KLH 溶液中，4 ℃搅拌反应过夜，移入透析袋，4 ℃于 0.01 mol/L PBS (pH 7.4)中透析 3 d，每天更换 3 次透析液，取出后计算浓度，于-20 ℃冰箱储存备用。

分别对透析后的免疫原、载体蛋白和展青霉素进行紫外可见全波长扫描分析，通过比较载体蛋白在偶联前后的图谱变化来初步判断偶联反应是否成功。

#### 1.2.4 展青霉素抗体的制备

用于免疫的新西兰大耳白兔为健康雄性，月龄为 3 个月，体重为 1.5 kg，采用皮下和肌肉多点注射法。取 1 mg 免疫原用新鲜配制的生理盐水稀释成浓度为 1 mg/mL 溶液，与等体积的弗氏佐剂充分乳化后，于兔背部皮下多点注射。第一次免疫用弗氏完全佐剂，加强免疫用弗氏不完全佐剂。每次每只兔子的免疫原用量为 1 mg，免疫间隔为 2 周。分别于第三、四次免疫后 8~10 d 后在兔耳缘静脉处采血，分离血清后用间接 ELISA 检测血清效价。在最后一次免疫 7~10 d 后股动脉采全血，采得的全血经 4 ℃，10000 r/min 离心处理后收集全部血清分装，储存于-20 ℃条件下备用。

#### 1.2.5 抗血清效价测定

本实验中抗血清效价采用间接竞争 ELISA 法测定，具体步骤如下：

（1）包被：包被原经包被液稀释至 10 μg/mL，加入到聚苯乙烯酶标板上，每孔 100 μL，4 ℃孵育过夜（或者 37 ℃孵育 3 h）后弃去孔中液体，用 PBST 洗液洗板 250 μL/well，共 3 次，震荡 2 min/次，最后一次洗涤后甩去板内的洗液在滤纸上拍干。

（2）封闭：封闭液为 0.5%脱脂乳粉，200 μL/well 进行封闭，37 ℃孵育 1 h 后弃去封闭液，用 PBST 洗液洗板 3 次。

（3）加样：加入用 PBS 缓冲液 2 倍梯度稀释抗血清稀释液 50 μL/孔，及标准品（100 ng/mL）50 μL/孔，在 37 ℃下反应 1 h，然后用 PBST 洗液洗板 4 次；

（4）加酶标二抗：在板内加入用 PBS 缓冲液稀释 20000 倍的羊抗兔酶标二抗 100 μL/孔，在 37 ℃反应 30 min，然后用 PBST 洗液洗板 5 次；

（5）显色：每孔加入 100 μL 底物液，在 37 ℃下反应 30 min；

（6）终止：每孔加入 50 μL 终止液终止反应；

（7）读数与计算：在 450~650 nm 波长下，用酶标仪读取吸光值（OD)。选择吸光度值在 0.8~1.2 区间内的抗血清稀释倍数，为抗血清效价。

对于抗血清效价的测定，将抗血清用 PBS 稀释 1000 倍，然后再进行 2 倍梯度稀释，即稀释倍数依次为：1000、2000、4000、8000、16000、32000、64000、128000、256000 和 512000，选取 OD 平均值在 0.8~1.2 范围内的抗血清稀释度，即为抗血清效价。

## 2 结果与讨论

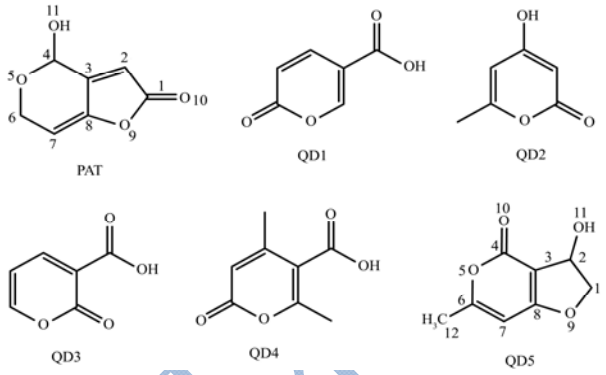



图 1 展青霉素及结构类似物的化学结构

**Fig. 1 Chemical structures of patulin and structural analogs**

通常，具有免疫原性的物质的分子量应大于 10000；展青霉素的分子量 154，属于小分子物质，没有免疫原性，必须将其与生物大分子偶联成为具有免疫原性的完全抗原[16]。展青霉素化学结构简单，虽然具有可修饰的羟基基团，但毒性大、原药价格昂贵；因此，可以通过计算机模拟技术寻找结构类物合成免疫原。首先，按照结构相似度 60%进行搜索，选择出与 5 个展青霉素结构类似的化合物（QD1-QD5），如图 1 所示。通过对展青霉素及结构类似物进行分子叠合和静电势模拟，从空间结构和电性作用两个方面进行比较分析，最终确定展青霉素类似物结构。

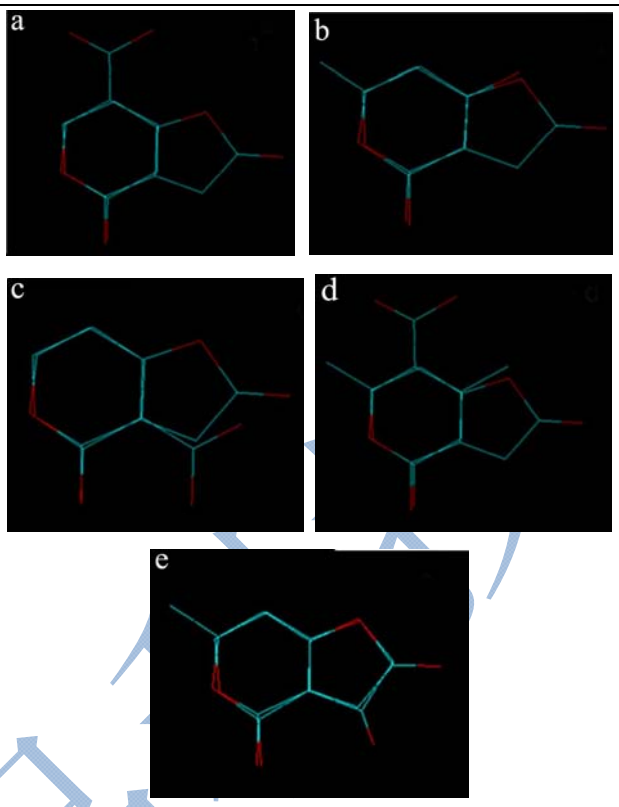



图 2 展青霉素与结构类似物两两叠合图

**Fig. 2 Two-two alignment of patulin and structural analogs**

注：a 表示 PAT 和 QD1；b 表示 PAT 和 QD2；c 表示 PAT 和 QD3；d 表示 PAT 和 QD4；e 表示 PAT 和 QD5。

分子叠合技术是通过骨架叠合的方法分析化合物空间结构的相似程度。因此，以展青霉素作为模板分子，5 个结构类似物分别与其两两叠合图，如 2 所示。通过两两叠合结果可以清晰地看出，化合物 QD1 和 QD5 在空间结构中与展青霉素相似度较高。化合物 QD1 仅具有一个简单的六元环结构，其羧基与展青霉素 C7 原子叠合，六元环部分较好的叠合，但 QD1 结构中缺少五元环结构。然而 QD5 在空间结构上与展青霉素得到很好地吻合，结构非常类似，同时具有可修饰的羟基基团，因此，空间结构相似性上选择化合物 QD5。为了进一步说明两者的差异，对展青霉素与化合物 QD5 两种物质进行原子标号，如图 1 所示。通过仔细对比发现，展青霉素与化合物 QD5 主要差别在于 C1、C2、C4 和 C6 原子上所连基团的不同。

为了进一步说明展青霉素与化合物 QD5 两种物质的电性差异，比较两种化合物的静电势，如图 3（a、b）所示。图中可以看出，展青霉素在 C2、C3、C4、O5、C8、O9、O10 和 O11 分子区域电荷密度较高，呈现一定负电区域；C6、C7 和 C12 分子区域电荷密度较低，呈现一定正电区域。因此，根据电荷正负相吸理论，C6 和 C7 分子区域容易与抗体结合位点的负

电荷集中位置发生作用；反之亦然。而化合物 QD5 中 C2 羟基的存在，负电区域在分子结构中分布较为均匀。展青霉素 C1 位置连有羰基吸电子基团，分子区域电子密度较高，而 QD5 中 C1 位置电子密度相对较低。但整体上看，展青霉素分子与 QD5 中的负电、正电区域具有一定的重合性，所以从静电势分布分析，化合物 QD5 为最适展青霉素类似物。

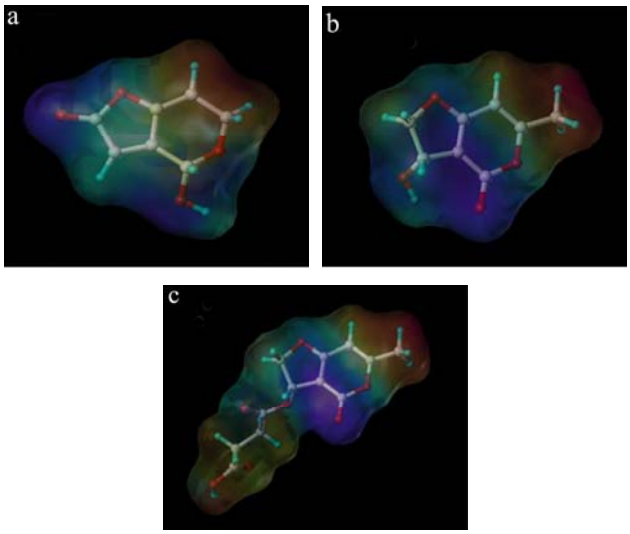



图 3 展青霉素（a）、化合物 QD5（b）及半抗原（c）的静电势图

**Fig. 3 Electrostatic potential surface of patulin (a), compound QD5 (b), and hapten (c)**

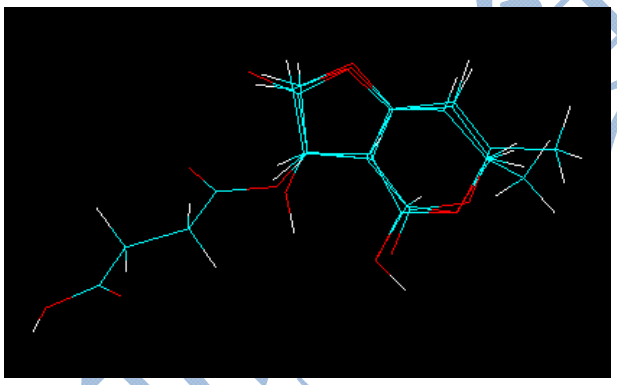


图 4 展青霉素、化合物 QD5 及半抗原分子叠合图

**Fig. 4 Alignment of patulin, compound QD5, and hapten**

半抗原设计既要最大限度地保留药物分子的结构特征，又要具有适当的基团（羧基、羟基或氨基等）方便与载体蛋白结合。最常用的方法是在药物分子上进行衍生化获得半抗原，这些方法有很多的经验性、随机性、盲目性。利用分子模拟技术从理论上分析药物分子结构特点，寻找相似度最高的化合物设计合成半抗原，大大提高了半抗原的成功效率[17]。由于化合物 QD5 化学结构上具有羟基基团，可以采用琥珀酸酐法来合成展青霉素类似物的半抗原（PATH）。由于半抗原比 QD5 多了一个 4C 臂，同样采用分子叠合技术比较展青霉素、QD5 及半抗原空间结构的差异，三者叠合图如图 4 所示。图中可以看出，整体上三个分子在空间结构上能够较好地叠合。展青霉素与半抗原分子结构叠合的差别主要也在于 C1、C2、C4 和 C6 原子位置上所连基团的差异，由于力场的存在，目标半抗原分子结构在 C2 位置上碳链的延伸影响了分子环状结构的空间构型，在叠合中出现轻微的偏移。同时，静电势分析半抗原分子电性质，其静电势图如图 3(c) 所示。结果发现，化合物 QD5 在 C2 位置羟基增加碳链得到半抗原后，碳链的延伸使得 C1 位置电子密度分散，负电性有所降低；其他位置电子分布情况与展青结构类似物 QD5 相似，静电势分布重合高，表现为相近的静电性质。综上所述，半抗原分子与展青霉素空间结构及电子分布两方面相似性好，可以进一步与载体蛋白偶联获得免疫原。

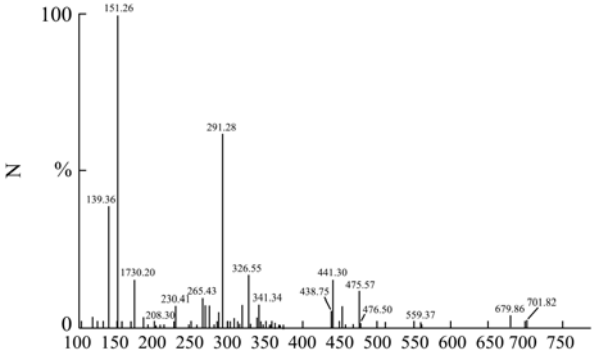
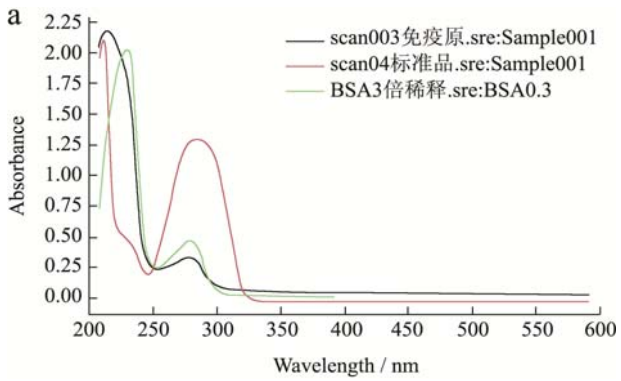



图 5 半抗原的质谱图

**Fig. 5 MS spectrum of hapten**

通过分子模拟技术，利用分子叠合及静电势图分析半抗原的理论可行。实验中，采用琥珀酸酐法合成展青霉素类似物的半抗原（PATH）。半抗原采用柱层析分离纯化，比移值 $R_f$=0.33（石油醚:乙酸乙酯=1:1）；同时采用质谱进行鉴定，质谱结果如图 5 所示，ESI-MS(*m/z*)：291.28 $[M+Na]^+$，($C_{12}H_{12}O_7$，Mr=268.22)。质谱结果可以判断半抗原成功合成。半抗原含有羧基基团，采用活化酯法进行人工抗原的合成。分别偶联两种载体蛋白（BSA，KLH）制备两种人工免疫原（PATH-BSA，PATH-KLH）。



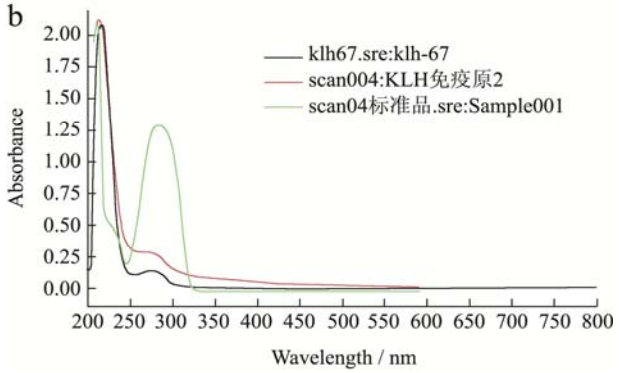



图 6 PATH-BSA 及 PATH-KLH 免疫原的紫外全波长扫描图

**Fig. 6 UV-Vis spectra of PATH-BSA and PATH-KLH**

透析纯化后，紫外分光光度计进行全波长扫描对免疫原进行鉴定，如图 6 所示。图中可以看出，免疫原的吸收峰与半抗原和 BSA 或 KLH 的吸收峰均有差别，这表明两种人工免疫原已经成功制备。

随着加强免疫的进行，两种免疫原获得的抗血清效价都逐渐提高。第四次采血后，由 PATH-BSA 免疫获得的抗血清效价达到 1:16000；由 PATH-KLH 免疫获得的抗血清效价达到 1:64000。第一次取血后，抗血清对展青霉素（1 μg/mL）的抑制率小于 10%；第二和第三次取血后，抗血清对展青霉素（1 μg/mL）的抑制率仍然没有得到很好地提高。分析原因：一方面由于半抗原化学结构相对简单，半抗原与载体蛋白偶联效果不理想；另一方动物免疫数量较少个体差异较大，制备针对展青霉素具有高特异性的抗体十分困难。分子模拟的结果显示，半抗原结构与展青霉素相似度很高，因此后期进一步通过加大动物免疫次数及调整免疫程序继续进行免疫增强制备高特异性抗体。

## 3 结论

展青霉素普遍存在腐烂的水果中，其具有潜在毒性且原药价格昂贵，以往免疫分析中半抗原多数通过原药的适当修饰获得，成本高，效果不佳。对于小分子目标物，半抗原的合成是制备高质量抗体的关键所在。论文借鉴活性药物虚拟筛选的理论，通过稳定构象下静电势分布及分子叠合方法对展青霉素类似物进行筛选，获得毒性较弱、性质稳定和价格便宜的替代物。

## 参考文献

[1] 周克权.展青霉素的化学检测方法[J].国外医学卫生学分册,2001,28(1):29-32
ZHOU Ke-quan. The chemical detection method of patulin [J]. Foreign Medical Hygiene Booklet, 2001, 28(1): 29-32

[2] Llewellyn G C, Mccay J A , Brown R D, et al. Immunological e-valuation of the mycotoxin patulin in female B6C3F1 mice [J]. Food Chem. Toxicol., 1998, 36(12): 1107-1115

[3] Yuan Y, Zhuang H, Zhang T, et al. Patulin content in apple products marketed in Northeast China [J]. Food Control, 2010, 21(11): 1488-1491

[4] Marín S, Mateo E M, Sanchis V, et al. Patulin contamination in fruit derivatives, including baby food from the Spanish market [J]. Food Chemistry, 2011, 24(2): 563-568

[5] Zaied C, Abid S, Hlel W, et al. Occurrence of patulin in apple based foods largely consumed in Tunisia [J]. Food Control, 2013, 31(2): 263-267

[6] Duan J H, Yuan Z H. Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues [J]. Agricultural and Food Chemisty, 2001, 49(3): 1087-1089

[7] He Q H, Xu Y, Zhang C-Z, et al. Phage-borne peptidomimetics as immunochemical reagent in dot-immunoassay for mycotoxin zearalenone [J]. Food Control, 2014, 39: 56-61

[8] Roberta G, Francesca D, Simone M, et al. Development and validation of a new qualitative ELISA screening for multiresidue detection of sulfonamides in food and feed [J]. Food Control, 2014, 35(1): 300-310

[9] Ying L, Wei J, Yong C. A novel chemiluminescent ELISA for detecting furaltadone metabolite, 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone (AMOZ) in fish, egg, honey and shrimp samples [J]. Journal of Immunological Methods, 2013, 395(1): 29-36

[10] Odenbaugh A L, Helms E D, Iverson B L. An investigation of antibody acyl hydrolysis catalysis using a large set of related haptens [J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2000, 8(2): 413-426

[11] Basta P V, Adcock A F, Tallent C, et al. Preparation of monoclonal antibodies reactive to the endogenous small molecule, anandamide [J]. Journal of Immunological Methods, 2004, 285(2): 181-195

[12] McElroy L J, Weiss C M. The production of polyclonal antibodies against the mycotoxin derivative patulin hemiglutarate [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1993, 39(9): 861-863

[13] De Champdore M, Bazzicalupo P, De N L, et al. A new competitive fluorescence assay for the detection of patulin toxin [J]. Analytical Chemistry, 2007, 79(2): 751-757

[14] 田园.展青霉素特异性抗体的制备及其免疫学检测方法的

研究[D].泰安:山东农业大学,2012
TIAN Yuan. Preparation of patulin specific antibodies and their application in development of immunoassay for patulin [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2012

[15] Bertin-Maghit S M, Capini C J, Bessis N, et al. Improvement of collagen-induced arthritis by active immunization against murine IL-1 [beta] peptides designed by molecular modeling [J]. Vaccine, 2005, 23(33): 4228-4235

[16] Vallejo R P, Bogus E R, Mumma R O. Effects of hapten structure and bridging group on Antisera specificity in parathion immunoassay development [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1982, 30(6): 572-580

[17] 刘毅华,朱国念,桂文君.分子模拟在农药半抗原设计及其免疫识别机制中的应用[J].农药学学报,2007,9(3):201-208
LIU Yi-hua, ZHU Guo-nian, GUI Wen-jun. Application of molecular modeling for the hapten design in the immunochemical analysis of pesticide residue and immune recognition mechanism [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2007, 9(3): 201-208

现代食品科技