

黄曲霉毒素 B₁ 人工抗原的合成及鉴定

伍鑫茹¹, 杨雪娇², 赵肃清³, 张焜^{1,3}

(1. 五邑大学化学与环境工程学院, 广东江门 529020) (2. 东莞出入境检验检疫局, 广东东莞 523072)

(3. 广东工业大学轻工化工学院, 广东广州 510006)

摘要: 采用衍生化在黄曲霉毒素 B₁(aflatoxin B₁, AFB₁) 上引入羧基合成 AFB₁ 羧甲基活化物, 通过 N-羧琥珀酰亚胺酯(N-hydroxy-succinimide NHS) 法将 AFB₁O 与牛血清白蛋白(BSA)偶联, 制备黄曲霉毒素 B₁ 完全抗原 AFB₁-BSA。ECI-MS 和紫外光谱法的鉴定结果表明目标半抗原合成成功。结合紫外分光光度法和回归方程, 分别测得不同浓度的半抗原和蛋白质线性曲线为: $Y=0.1440X+0.0103$, $R^2=0.9986$; $Y=0.0059X+0.0808$, $R^2=0.9889$ 。偶联物中半抗原和蛋白质的浓度分别为 186.32 μg/mL、6127.46 μg/mL, 即求得抗原分子结合比为 5.13:1, 从而为制备抗 AFB₁ 抗体奠定基础。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁; 半抗原; 完全抗原; NHS 法

文章编号: 1673-9078(2013)4-796-799

Synthesis and Identification of Aflatoxin B₁ Artificial Antigen

WU Xin-ru¹, YANG Xue-jiao², ZHAO Su-qing³, ZHANG Kun^{1,3}

(1. Chemistry and Environmental engineering institute of WuYi University, Jiangmen 529020, China)

(2. The bureau of entry and exit inspection and quarantine in Dongguan, Dongguan 523072, China)

(3. Light industry and chemical institute of Guangdong industry university, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Carboxyl group was introduced to Aflatoxin B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) by derivatization method to synthesis the hapten (AFB₁ carboxymethyl activator). And the AFB₁O was coupled with BSA by using N-hydroxy-succinimide method to prepare the complete antigen of AFB₁. The results of ECI-MS and ultraviolet spectroscopy showed that the target hapten was successfully synthesized. Through combined with ultraviolet spectrophotometry and regression equation, the standard curves of the different concentration hapten and BSA were obtained as follow: $y=0.1440x+0.0103$ ($R^2=0.9986$) and $y=0.0059x+0.0808$ ($R^2=0.9889$) respectively. The concentrations of AFB₁O and BSA in adduct were 186.32 μg/mL and 6127.46 μg/mL respectively, and the molar ration was 5.13:1.

Key word: aflatoxin B₁; hapten; complete antigen; N-hydroxy-succinimide method

黄曲霉毒素 B₁ 是真菌的次级代谢产物, 主要由黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉 (*A. parasiticus*) 和特曲霉 (*A. nomius*) 产生^[1]。国际癌症研究机构 (IARC)^[2] 将 AFB₁ 划分为 I 类致癌物, 将 AFB₂、G₁、G₂ 作为 II 类可疑致癌物。AFB₁ 作用的主要靶器官是肝脏, 不仅毒性最大而且占黄曲霉毒素总量的 70% 以上^[3]。因此加强对它的检测监控对维护食品安全和人类健康有着重要意义。

目前多采用简便、快速和灵敏的免疫学检测方法对其进行定量分析。黄曲霉毒素 B₁ 是小分子物质, 分子量为 312.3, 只有将其与大分子载体蛋白偶联, 才能作为免疫原或检测抗原。本研究采用 NHS 法制备了

收稿日期: 2012-12-05

基金项目: 广东出入境检验检疫局科技项目 (2011GDK56)

作者简介: 伍鑫茹 (1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物的提取及精细化学品合成与研究

通讯作者: 张焜 (1962-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 天然产物化学

黄曲霉毒素 B₁ 人工抗原, 通过 UV 与 ECI-MS 法对活化反应进行鉴定, 确定了半抗原合成成功, 并就黄曲霉毒素 B₁ 与牛血清白蛋白在偶联产物中浓度比进行研究, 为黄曲霉毒素 B₁ 单抗的制备及免疫学快速检测方法的建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

Cary 50 紫外可见分光光度计, 美国瓦里安; QUattro Premier XE MICROMASS, 美国 WATERS; IKA-MS-3-digital: 美国 IKA; 真空冷冻干燥机: Virtis; 3K-15 高速冷冻离心机, Sigma; DK-8D 电热恒温水槽; 超纯水仪; 万分之一电子天平; 透析袋 (MWCO:7000), 上海源叶生物科技有限公司; 黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁, 99%, Fermentek)、牛血清白蛋白 (BSA)、羧甲基羟胺半盐酸盐 (CMO)、N-羧琥珀酰亚胺 (NHS, 98%) 均为 Sigma 公司产品; 考马斯亮

蓝 G250 为上海源叶生物科技有限公司; 吡啶、N,N-二环己基碳酰亚胺 (DCC)、二甲基甲酰胺、无水四氢呋喃、甲醇、碳酸氢钠为分析纯试剂。

1.2 AFB₁ 的活化与鉴定

综合文献^[4-6], 并加以改进的方法: 称取 5 mg AFB₁ 与 10 mg CMO 溶解于 500 μL 吡啶中, 25 °C 避光振荡反应 24 h, 将反应产物冷冻干燥 24 h 得到白色粉末即为 AFB₁ 活化物 AFB₁O, 直接用于 UV 鉴定和质谱鉴定。反应路线见图 1。

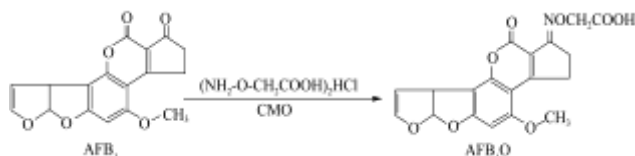


图 1 半抗原合成路线

Fig.1 The route of the preparation of the hapten

质谱鉴定条件: EIC: ACQUITY UPLC@ BEH C₁₈ (1.7 μm×2.1×50 mm) 柱, 柱温 30 °C, 流动相甲醇和水为 30:70, 流速 0.25 mL/min; MS: 毛细管电压 3.0 KV, 锥孔电压 45 V, 出口电压 2 V; EI 离子源温度为 110 °C, 脱溶剂气温度 350 °C, 脱溶剂气流速 700 L/h, 锥孔气流速 50 L/h, 溶剂延迟 3 min。

1.3 AFB₁ 完全抗原的合成

采用 DCC 法合成 AFB₁-BSA 人工抗原, 具体方法如下^[7-8]: 称取 50 mg BSA 溶于 1 mL 0.13 mol/L 的 NaHCO₃ 溶液制成 5% BSA 活化液, 测定 pH 值为 7.6。称取 1 mg AFB₁O、1.073 mg DCC 和 0.598 mg NHS, 将其溶解于无水四氢呋喃, 30 °C 振荡 24 h, 然后 4000 r/min 离心 15 min, 并用无水四氢呋喃洗涤沉淀 2~3 次, 然后将上清液合并, 待上清液中的四氢呋喃挥发完全后, 将残留物溶于 0.2 mL 二甲基甲酰胺。将此溶液缓慢逐滴滴加到活化的 BSA 中, 置于振荡器上, 避光室温反应过夜。反应产物在 4 °C 搅拌下用 PBS 透析 3 d, 每天换液 3~6 次, 透析后得到纯化的 AFB₁-BSA 储存于 -20 °C。其合成路线见图 2。

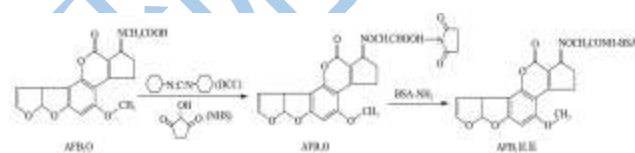


图 2 AFB₁-BSA 完全抗原合成路线

Fig.2 The route of the preparation of AFB₁ complete antigen

1.4 完全抗原分子结合比测定^[9-11]

紫外分光光度法: 采用分光光度法进行结合比率的估测。偶联物是由两种分子 (蛋白质-半抗原) 组成, 两种分子均有各自不同的紫外吸收峰, 根据朗伯-比尔定律, 吸光度具有加和性, 即混合物的总吸光度等于

混合物中各组分的吸光度之和。所以分别求的偶联物中半抗原的浓度和蛋白质的浓度, 根据下面的公式计算出偶联物中蛋白质与半抗原的偶联比。

$$\text{偶联比} = \frac{(C_{\text{半抗原}} \times M_{\text{蛋白质}})}{(C_{\text{蛋白质}} \times M_{\text{半抗原}})}$$

注: C_{半抗原}, C_{蛋白质} 分别为半抗原和蛋白质的浓度; M_{半抗原}, M_{蛋白质} 分别为半抗原和蛋白质的分子量。

1.4.1 偶联物半抗原的浓度测定

配制 AFB₁O 质量浓度为 1.2、2.4、3.6、4.8、6.0 μg/mL 等不同浓度梯度的 PBS 溶液, 并分别进行 200~400 nm 波长范围紫外光谱扫描, 从紫外图谱上读出半抗原特征吸收峰处的吸光度 A, 以半抗原浓度对吸光度 A 作标准吸收曲线, 并求得回归方程。将透析后得到的人工抗原稀释成一定浓度, 进行紫外光谱扫描, 将偶联物中半抗原的特征吸收峰处的吸光度值代入上述的回归方程, 从而求得偶联物中半抗原的浓度。

1.4.2 偶联物蛋白质浓度测定

根据考马斯亮蓝法测定偶联物中蛋白质的浓度。配制 BSA 质量浓度为 0、10、20、40、60、80、100 μg/mL 的磷酸盐缓冲溶液, 各取 1.0 mL, 加入 5 mL 考马斯染色液, 混匀放置 2 min, 在 595 nm 处测其吸光度值。以牛血清白蛋白含量 (μg) 为横坐标, 以吸光度为纵坐标, 绘出标准曲线。同法处理偶联物, 测得偶联物在 595 nm 处的吸光度值, 对照标准曲线即可得到偶联物中的蛋白质质量浓度。

2 结果与分析

2.1 半抗原的鉴定

2.1.1 UV 鉴定结果

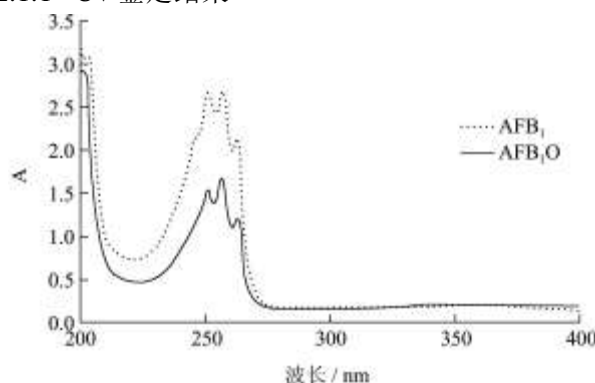


图 3 AFB₁ 和 AFB₁O 的紫外吸收谱图

Fig.3 UV absorbance spectrum of AFB₁ and AFB₁O

用 pH=7.6 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 为溶剂, 分别配制 0.003 mg/mL 的 AFB₁ 和 0.008 mg/mL 的 AFB₁O, 采用紫外分光光度计进行扫描, 得到如下所示谱图 3, 可以看出半抗原的特征吸收峰相对 AFB₁ 有一定程度的偏移, 接着通过高效液相色谱-质谱联用仪 (EIC/MS), 进一步确定生成 AFB₁ 羧甲基活化物。

2.1.2 EIC/MS 鉴定结果

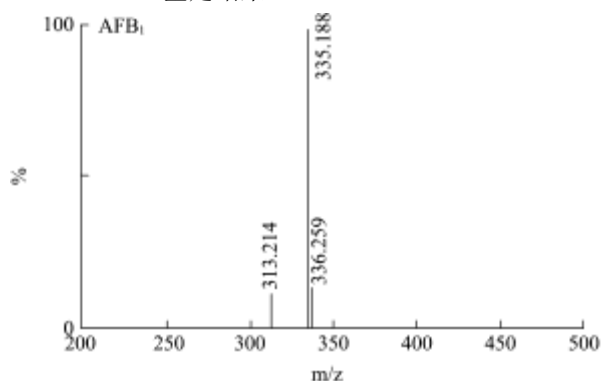


图4 AFB₁的质谱图

Fig.4 The ESI Mss spectrum of AFB₁

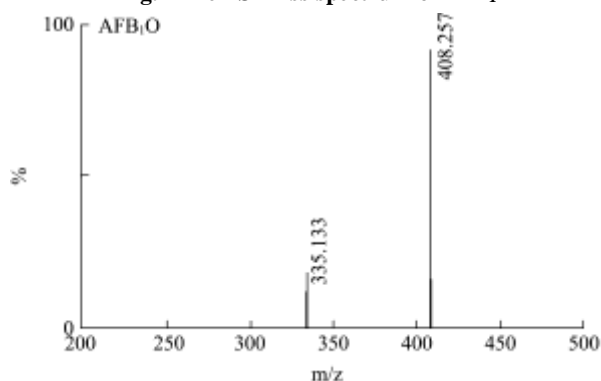


图5 AFB₁-O的质谱图

Fig.5 The ESI Mss spectrum of AFB₁-O

图4、5显示的是 AFB₁ 标准品、AFB₁ 半抗原的电喷雾质谱图。AFB₁ 的相对分子质量为 312.3，则图4中 m/z 313.214、 m/z 335.188 分别是 AFB₁ 的准分子离子峰 $[AFB_1+H]^+$ 和 $[AFB_1+Na]^+$ ；与此对应图5中 m/z 408.257^[12-13] 是 AFB₁ 羧甲基活化物的准分子离子峰 $[AFB_1-O+Na]^+$ ，即活化物的相对分子质量为 385.2，与应得产物 C₁₇H₁₂O₆ 的相对分子质量基本一致。 m/z 335.133 为 AFB₁ 羧基活化物分子断裂的碎片峰， $[AFB_1+Na]^+$ 。综合 UV 和 ECI/MS 分析结果，可初步断定活化产物是 AFB₁ 羧基活化物，半抗原合成成功。

2.2 完全抗原的紫外扫描

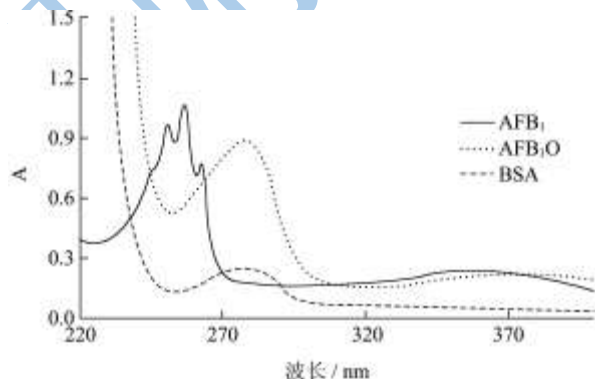


图6 AFB₁、BSA 和 AFB₁-BSA 的紫外光谱扫描

Fig.6 UV absorbance spectrum of AFB₁、BSA and AFB₁-BSA

AFB₁ 完全抗原的紫外扫描图见图6。对比3条曲线可以看出，人工抗原紫外光谱在 $\lambda=279.6$ nm, $\lambda=377$ nm 有特征吸收峰，牛血清白蛋白 (BSA) 在 $\lambda=278.4$ nm 有特征吸收峰，而 AFB₁ 有四个特征吸收峰分别为 251 nm、257 nm、262 nm、363 nm。三者相比较，特征吸收峰发生了明显变化，间接说明半抗原已与蛋白质发生偶联，成为完全抗原。

2.3 完全抗原偶联比的测定

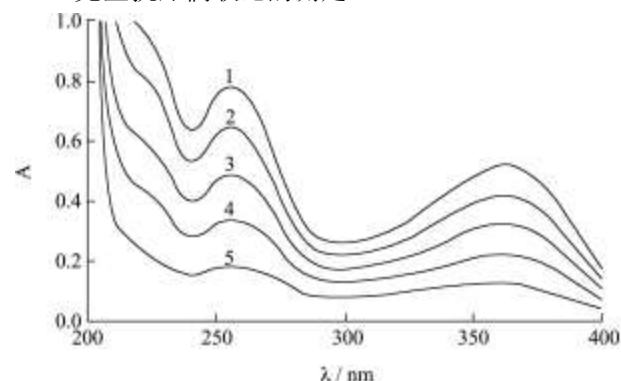


图7 不同浓度的半抗原紫外扫描图

Fig.7 UV absorbance spectrum of the different concentration haptens

注：1: AFBO-6, 2: AFBO-4.8, 3: AFBO-3.6, 4: AFBO-2.4, 5: AFBO-1.2。

分别对不同浓度半抗原在 200~400 nm 波长范围进行紫外扫描(见图7)，随着半抗原浓度的增大，其特征吸收波长 $\lambda=255$ nm 处的吸光度呈现性升高。用不同半抗原浓度和相对应的吸光度值 ($A_{\lambda=255}$) 作线性回归计算，所获得的线性校正标准曲线，回归方程为： $Y=0.1440X+0.0103$, $R^2=0.9986$ 。实验测得的标准曲线具有很好的相关性，检测的吸光度值与半抗原的浓度呈极显著线性关系。参照标准曲线的制作步骤，取人工抗原 0.5 mL，稀释后测其在特征吸收峰处的吸光度 $A_{\lambda=255}$ nm 为 0.5469，代入线性方程 $Y=0.1440X+0.0103$ 得 3.7264，则完全抗原中半抗原的浓度为 $C_{AFB_1O} = 186.32 \mu\text{g} / \text{mL}$ 。

表1 不同浓度蛋白在 $\lambda=595$ nm 处的吸光度值

Table 1 Absorbent values of different concentration of BSA examined by the UV spectrum

CBSA/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	10	20	40	60	80	100
A	0.11	0.21	0.35	0.44	0.54	0.67

由考马斯亮蓝法测得的不同蛋白浓度在 $\lambda=595$ nm 处所对应的吸光度值见表1，根据表1进行线性回归计算，得到蛋白质的线性标准曲线，其回归方程为 $Y=0.0059X+0.0808$, $R^2=0.9889$ ；将合成抗原稀释到同浓度，测其在 $\lambda=595$ nm 处的吸光度值为 1.8884，代

入回归方程得 306.373, 则偶联物中蛋白浓度为 $C_{BSA}=6127.46 \mu\text{g/mL}$ 。

将 C_{AFB1O} 和 C_{BSA} 代入下面公式, 偶联比 = $(C_{\text{半抗原}} \times M_{\text{蛋白质}}) / (C_{\text{蛋白质}} \times M_{\text{半抗原}})$, 得到偶联比为 5.13:1。

3 结论

3.1 AFB₁ 是一种小分子, 本身没有免疫原性, 只有与大分子载体蛋白 BSA、OVA 成功偶联, 才能产生免疫。本实验用 CMO 将 AFB₁ 活化成含有羧基的 AFB₁O, 将活化物进行紫外、质谱扫描, m/z 408.257 是 AFB₁ 羧甲基活化物的准分子离子峰 $[\text{AFB}_1\text{-O}+\text{Na}]^+$, 活化物的相对分子质量为 385.2, 与应得产物 C₁₇H₁₂O₆ 的相对分子质量基本一致。证明半抗原合成成功。

3.2 通过 NHS 法将其与 BSA 偶联, 制备出人工全抗原 AFB₁-BSA, 不同于黄增德^[1]、胡晓飞^[3]等人的操作方法, 本文采用一种新的方法计算抗原结合比, 结合紫外分光光度法和回归方程, 分别测定不同浓度的蛋白质和半抗原的特征吸收曲线, 由不同浓度的蛋白质、半抗原及其所对应的吸光度值, 获得两个标准曲线方程, 将稀释后的偶联物代入方程, 从而分别求出偶联物中半抗原和蛋白质的浓度, 最终得到偶联比为 5.13:1。此法操作简单, 损耗少、样品可以重复使用, 两个回归方程使得结果更准确。

3.3 一般认为, 每个 BSA 分子上连接 5~20 个半抗原为宜。李俊锁等^[4]认为以血清蛋白为载体, 偶联比一般应以 10 左右为宜, 而且低偶联比有助于提高抗体的选择性和亲和力。所以可以认为获得了具有较好偶联比的完全抗原, 为进一步制备抗 AFB₁ 抗体提供了较好的免疫原, 为建立 ELISA 法快速检测 AFB₁ 提供了研究基础。

参考文献

[1] 江湖,熊勇华,黄增德.EDC 法制备黄曲霉毒素 B₁ 人工抗原的研究[J].食品科学,2005,26(7):125-128

- [2] Meritxell V A, Ivan A, Jordi D, et al. Determination of aflatoxins B₁, G₁, B₂ and G₂ in medicinal herbs by liquid Chromatography-tandem mass Spectrometry [J]. J. Chromatography.A, 2004, 1048(3):25-29
- [3] 王磊,胡晓飞,职爱民.黄曲霉毒素 B₁ 人工抗原及鼠源多克隆抗血清的制备[J].食品科技,2011,36(3):277-281.
- [4] Chu F S, Veno I. Production of antibody against aflatoxin B₁[J]. Appl Environ Microbiol, 1977, 33(5):1125-1128.
- [5] 孙秀兰,张银志,汤坚,等.黄曲霉毒素 B₁ 完全抗原构建中结合位点研究[J].食品与生物技术学报,2007,26(5):99-103
- [6] Shim W B, Yakovleva M E, Kim K Y, et al. Development of Fluorescence Polarization Immunoassay for the Rapid Detection of 6-Chloronicotinic Acid: Main Metabolite of Neonicotinoid Insecticides [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(3):791-796
- [7] 孙兴荣,裴世春,柳家鹏.抗黄曲霉毒素 M₁ 免疫亲和柱的制备[J].现代食品科技,2011,27(3):306-309
- [8] 柴春彦,徐明刚,刘国艳.过氧化氢酶-氯霉素偶联物的合成及其结合比的测定[J].中国兽医学,2006,36(5):406-410
- [9] 石春红,章银珠,俞晔.双酚 A 完全抗原的制备[J].食品与生物技术学报,2008,27(3):37-40
- [10] 郑劫,张焜,赵肃清.双酚 A 人工抗原的光谱表征和免疫鉴定研究[J].光谱学与光谱分析,2008,28(7):583-586.
- [11] Christian C, Dietmar K, Michael G. Weller and Reinhard N. Novel Aflatoxin Derivatives and Protein Conjugates[J]. Molecules, 2007, 6(12): 641-653
- [12] 冯伟科,罗佳玲,赖毅东.高效液相色谱-串联质谱法同时测定花生制品中的黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂[J].现代食品科技,2011,27(8):1040-1042
- [13] Anna Y K, Liberty S, Frederic D. Lateral-flow colloidal gold-based immunoassay for the rapid detection of deoxynivalenol with two indicator ranges[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 616: 235-244
- [14] 李俊锁,钱传范.兽药残留免疫分析及进展[J].中国兽医学报,1998,18(4):411-415