

文章编号:1000-8551(2019)12-2414-07

B 族黄曲霉毒素抗原合成设计及特异性、广谱性抗体制备与特性分析

张海棠¹ 王晓斐¹ 职爱民² 王亚楠¹ 王自良^{1,*}(¹河南科技学院动物科技学院,河南 新乡 453003; ²河南旭瑞食品有限公司,河南 焦作 454150)

摘要:为制备 B 族黄曲霉毒素(BGAFs)特异性强、广谱性好的抗体,本研究根据黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)的分子结构和活性位点,采用脲化活泼酯法(OAE)、氨甲基化法(MOA)、混合酸酐法(MA)、半缩醛法(SA)、环氧化物法(EP)和烯醇醚衍生物法(EED)6种方法合成 BGAFs 人工抗原 AFB₁-BSA,并通过 UV 和 SDS-PAGE 进行鉴定;采用 AFB₁-BSA 免疫新西兰白兔制备多克隆抗体(AFB₁ pAb),间接 ELISA 检测 AFB₁ pAb 效价,间接竞争 ELISA(icELISA)分析其敏感性,交叉反应试验(CR)分析其特异性和广谱性。结果表明,AFB₁-BSA 合成成功,在 BGAFs 抗原合成的 6 种方法中 OAE 效果最好,AFB₁ 与 BSA 的分子结合比为 8.46:1;AFB₁ pAb 的间接 ELISA 效价为 1:(1.28×10⁴),IC₅₀为 10.32 μg·L⁻¹,与 AFB₂、AFG₁、AFG₂、AFM₁、AFM₂ 的 CR 分别为 75.21%、44.13%、14.72%、16.36%、1.44%。本研究制备出了高效价、敏感、特异、广谱的 AFB₁ pAb,为 BGAFs 免疫检测方法的建立奠定了物质和技术基础。

关键词:B 族黄曲霉毒素;抗原合成设计;多克隆抗体;特性分析

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2019.12.2414

目前,在食品污染中已发现的黄曲霉毒素(aflatoxin,AF)共有 20 多种,其中毒性强、污染广、含量高的是 B 族 AF(B group aflatoxins,BGAFs)。BGAFs 具有致癌性、致畸性和免疫抑制性等多种毒害作用,已成为食品 AF 污染检测的主要对象^[1]。BGAFs 包括 AFB₁ 和 AFB₂ 两种,两者与食品污染的关系密切,若两者同时存在,以 AFB₁ 污染为主,AFB₂ 污染伴随 AFB₁,具有毒性叠加效应^[2]。食品 BGAFs 污染最大残留限量标准(maximum residue limits,MRLs)的规定有两种,一是包括我国在内部分国家采用 AFB₁ 的 MRLs,如我国《GB 2761-2017 食品中真菌毒素限量》^[3]规定,玉米及其制品≤20 μg·kg⁻¹、稻谷及其制品≤10 μg·kg⁻¹、小麦及其制品≤5 μg·kg⁻¹;二是部分国家采用 BGAFs 总量(B₁+B₂)的 MRLs,如欧盟≤4 μg·kg⁻¹、日本≤10 μg·kg⁻¹、美国 FDA≤15 μg·kg⁻¹。目前食品 BGAFs 污染的分析方法主要有仪器分析和免疫分析,其中免疫分析因具有特异性强、灵敏度高、

操作简便、可大批量筛检和现场检测等优势,已成为不可或缺的技术手段。建立 BGAFs 免疫分析方法的关键是获得优秀的抗体,而半抗原设计和抗原合成是制备优秀抗体的前提^[4]。关于 BGAFs 抗原合成方法的研究国内外已有相关报道^[5-6],但有关不同半抗原分子设计、抗原合成及抗体特性比较分析方面的研究尚鲜见。本研究以 AFB₁ 为反应起始原料,通过不同 AFB₁ 半抗原分子设计与抗原合成方法制备多克隆抗体(polyclonal antibody,pAb),并对其特性进行分析,筛选出最佳半抗原分子设计与抗原合成方法,以期灵敏度、广谱、特异性强的 BGAFs 高质量单克隆抗体的制备奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 标准品,新加坡 Pribolab

收稿日期:2018-05-15 接受日期:2018-09-11

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划项目(2014BAD13B05),河南省产学研项目(162107000056)

作者简介:张海棠,女,教授,主要从事食品安全免疫检测研究。E-mail:792176339@qq.com

* 通讯作者:王自良,男,教授,主要从事食品安全生物技术研究。E-mail:wangziliang66@126.com

公司;阳离子化牛血清白蛋白(cationic bovine serum albumin, cBSA)、羊抗兔酶标二抗(GaRIgG-HRP),美国 Sigma 公司;酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)所用稀释液为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 值 7.4 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS),洗液为含 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Tween-20(PBST)的 PBS;封闭液为含 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 猪血清的 PBST;包被液为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 值 9.6 的碳酸盐缓冲液(carbonate buffer solution, CBS)。试验动物为 2 月龄,体重 $1 \pm 0.2 \text{ kg}$ 的雄性新西兰白兔,共 18 只,随机分为 6 组,每组 3 只,由新乡医学院实验动物中心提供。

1.2 BGAFs 人工抗原合成设计

根据 AFB₁ 分子结构上存在的活性位点(图 1),拟采用 6 种方法制备人工抗原 AFB₁-BSA(表 1)。

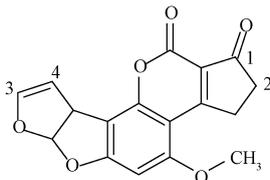


图 1 AFB₁ 结构式

Fig.1 Molecular structure of AFB₁

1.3 BGAFs 人工抗原鉴定

1.3.1 UV 扫描 用甲醇溶解 AFB₁,配制 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ AFB₁ 溶液;用 4:6(v/v)的甲醇 PBS 溶液分别溶解 BSA 和 AFB₁-BSA,配制 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 BSA 和 AFB₁-BSA 溶液。在波长 200~500 nm 下进行紫外扫描,按照公式计算 AFB₁ 与 BSA 的分子结合比^[18]:

$$A = \varepsilon CL \quad (1)$$

式中,A 为吸光值,仪器读出; ε 为摩尔消光系数,是常值;C 为溶液中溶质浓度;L 为光程,由仪器决定。

1.3.2 SDS-PAGE 鉴定 选择浓缩胶与分离胶浓度分别为 5%和 12%,电压分别为 90 v 和 60 v,加样量为每孔 10 μL ,蛋白质含量为每孔 10 μg 。采用 CWD-9403D 型紫外分析仪系统软件(北京六一仪器厂)计算 AFB₁ 与 BSA 的分子结合比。

1.4 AFB₁ pAb 制备

用 6 种不同方法合成的人工抗原分别免疫新西兰白兔,每种抗原免疫 1 组,共 6 组,每组 3 只。免疫剂量按 AFB₁-BSA 中 BSA 的量计算,每只 100 μg ,体积 1 mL,背部皮下 4~6 点注射,共免疫 5 次,每次间隔 3~4 周,第 5 次免疫后 2 周耳缘静脉采血,5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 分离多抗血清,采用饱和硫酸铵盐析法纯化

多抗血清,制备 AFB₁ pAb^[19]。

1.5 AFB₁ pAb 特性分析

1.5.1 效价测定 间接 ELISA^[20]。第一步,包被酶标板,用 CBS 稀释包被抗原 AFB₁-OVA,每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h,用 PBST 洗板 3 次;第二步,封闭酶标板,加封闭液,每孔 250 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h,洗板 3 次;第三步,加抗血清,加入用 PBS 倍比稀释的抗血清,每孔 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min,洗板 3 次;第四步,加酶标抗体,加入工作浓度的 GaMIgG-HRP,每孔 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 25 min,洗板 3 次;第五步,加酶底物,每孔 60 μL ,室温下显色 15 min;第六步,终止反应,加终止液 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$,每孔 100 μL ,用酶标仪读值,记录结果。反应设阴性对照(negative control, NC)和 PBS 空白对照(black control, BC),每次检测 3 个重复。酶标仪测定 A_{450} 值,以阳性/阴性(P/N)>2.1,且 P-N>0.2 为标准,计算抗体效价。

1.5.2 敏感性鉴定 间接竞争 ELISA(indirect competitive ELISA, icELISA)测定 AFB₁ pAb 对 AFB₁ 的半数抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC₅₀),以此判定敏感性^[21]。

1.5.3 特异性鉴定 以 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 为抑制剂,icELISA 法测定各抑制剂的 IC₅₀,然后按照公式计算交叉反应率(cross reaction percentage, CR)^[22]:

$$\text{CR} = (\text{AFB}_1 \text{ pAb 对 AFB}_1 \text{ 的 IC}_{50} / \text{AFB}_1 \text{ pAb 对其他抑制剂的 IC}_{50}) \times 100\% \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 BGAFs 人工抗原鉴定结果

2.1.1 UV 鉴定结果 由图 2 可知,在 200~500 nm 波长范围内,BSA 的特征峰位于 278 nm,AFB₁ 的特征峰位于 363 nm,OAE、MOA、MA、SA、EP、EED 6 种方法合成的人工抗原 AFB₁-BSA 均含有 BSA 和 AFB₁ 的特征峰,说明以上 6 种方法均可合成人工抗原 AFB₁-BSA。BSA 与 AFB₁ 的分子结合比计算结果见表 2。由表可知,以上 6 种方法合成的人工抗原 AFB₁-BSA,其分子结合比不同,其中,OAE 和 MA 两种方法效果较好。

2.1.2 SDS-PAGE 鉴定结果 由图 3 可知,6 种人工抗原 AFB₁-BSA 的条带均滞后于 BSA 的条带,说明 AFB₁-BSA 的分子量大于 BSA,由此可以判定 AFB₁-BSA 合成成功。

2.2 AFB₁ pAb 特性分析

2.2.1 效价测定 免疫结束后每组挑选 1 只间接 ELISA 效价最高的免疫兔进行比较分析,由图 4 可知,

表 1 AFB₁ 半抗原设计与抗原合成方法
Table 1 The hapten design and antigens synthesis of AFB₁

抗原合成设计 Antigen synthesis design					抗原合成路线 Antigen synthesis route	反应原理 Reaction principle
活性位点 Active site	活性基团 Active group	反应方法 Reaction method	引入基团 Introduction group	合成方法 Synthesis Method		
1	羰基	脲化	羧基	脲化活泼酯法 (OAE)		利用 AFB ₁ 的活性位点 1 位羰基脲化为 AFB ₁ O, 引入羧基活性基团, 采用活泼酯法在偶联剂二环己基碳二亚胺 (DCC) 作用下, AFB ₁ O 与 BSA 以单酰胺键形式合成 AFB ₁ -BSA ^[7-8] 。
2	活泼氢	曼尼希	氨基	氨基甲基化法 (MOA)		利用 AFB ₁ 的 2 位 α-活泼氢, 通过曼尼希反应, 使 α-活泼氢与 BSA 的氨基发生氨基甲基化反应, 以 Mannich 碱的形式偶联, 合成 AFB ₁ -BSA ^[9-10] 。
3	羟基	酸酐反应	羧基	混合酸酐法 (MA)		AFB ₁ 在 H ₂ SO ₄ 作用下转化为 AFB ₂ a, 利用活性位点 2 位羟基与酸酐反应, 产物为半酯化合物 AFB ₂ a-HS, 引入羧基活性基团, 采用混合酸酐法在偶联剂氯甲酸异丁酯 (IBC) 作用下, AFB ₁ O 与 BSA 以单酰胺键形式合成 AFB ₁ -BSA ^[11-12] 。
3	醛基	希夫氏	-	半缩醛法 (SA)		AFB ₁ 在 H ₂ SO ₄ 作用下缩合反应生成带有醛基活性位点的 AFB ₂ a, 其醛基可与 BSA 的氨基生成不稳定的希夫氏碱, 通过 NaBH ₄ 的还原作用, 合成抗原 AFB ₂ a-BSA ^[13-14] 。
3,4	双呋喃环	氧化	羟基	环氧化物法 (EP)		以二氯甲烷为溶剂, AFB ₁ 双呋喃环双键氧化形成 AFB ₁ 环氧化物, 与 BSA 的一级胺反应形成二级胺, 在环氧化物上引入一个羟基, 以单酰胺的形式与 BSA 偶联合成 AFB ₁ -BSA ^[15-16] 。
3,4	双呋喃环	乙醇酸	羧基	烯醇醚衍生物法 (EED)		AFB ₁ 分子结构含有活性位点双呋喃环, 可与乙醇酸反应生成带有活性基团羧基的 AFB ₁ 烯醇醚衍生物 (AFB ₁ -GA), 利用其羧基与 BSA 偶联合成 AFB ₁ -BSA ^[17] 。

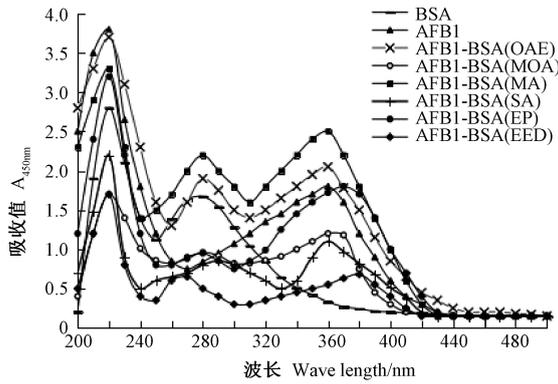


图 2 AFB₁-BSA 的 UV 图

Fig.2 UV spectra of AFB₁-BSA

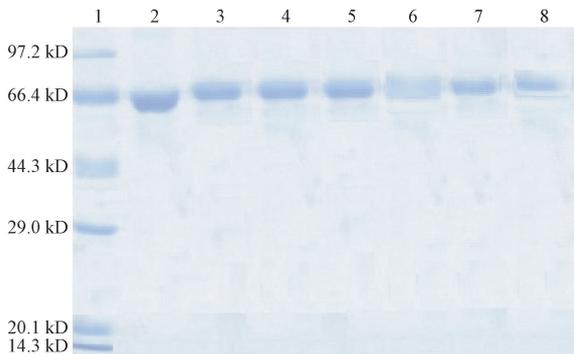
表 2 6 种方法所制备 AFB₁-BSA 的分子结合比

Table 2 Molecular binding ratio of AFB₁-BSA prepared by six methods

制备方法 Synthesis methods	AFB ₁ 与 BSA 起始摩尔比 Initial molar ratio of AFB ₁ to BSA	AFB ₁ -BSA 分子结合比 Molecular binding ratio of AFB ₁ -BSA	AFB ₁ 利用率 Usage ratio of AFB ₁ /%
OAE	50:1	8.64:1	17.28
MOA	50:1	6.88:1	13.76
MA	50:1	10.78:1	21.56
SA	50:1	4.46:1	8.92
EP	50:1	6.38:1	12.76
EED	50:1	2.31:1	4.62

注:BSA 与 AFB₁ 的分子量相比,BSA 为 66.446, AFB₁ 为 312,BSA 远大于 AFB₁,因而在计算利用率时,BSA 的利用率设定为 100%。

Note: Compared to the molecular weight of BSA and AFB₁, BSA is 66.446, AFB₁ is 312, BSA is much larger than AFB₁, so the utilization rate of BSA is 100% when the utilization ratio is calculated.



Note: 1:Maker. 2:BSA. 3:AFB₁-BSA(OAE). 4:AFB₁-BSA(MOA).

5: AFB₁-BSA(MA). 6:AFB₁-BSA(SA).7: AFB₁-BSA(EP).

8: AFB₁-BSA(EED).

图 3 AFB₁-BSA 的 SDS-PAGE 图

Fig.3 The SDS-PAGE photo of AFB₁-BSA

6 只免疫兔的间接 ELISA 效价均达到了 1:(1×10⁴),表明 6 种方法合成的 AFB₁-BSA 均具有良好的免疫原性,其中,以 OAE 组和 MA 组免疫效果最好,效价达到

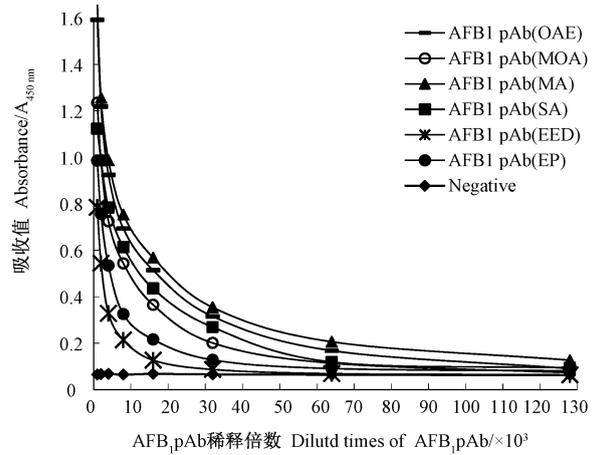
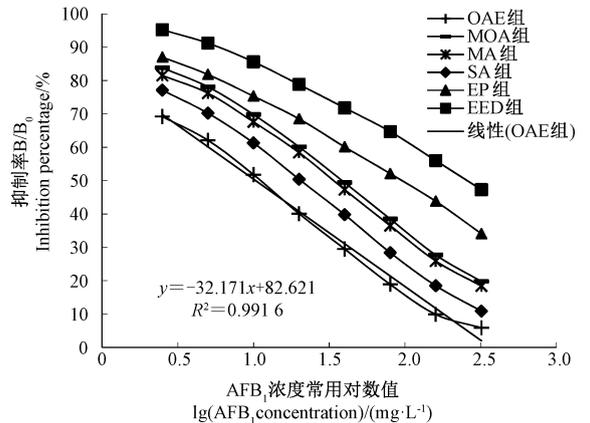


图 4 AFB₁ pAb 的间接 ELISA 效价测定图

Fig.4 The indirect ELISA titer curves of AFB₁ pAb

了 1:(1.28×10⁴)。

2.2.2 敏感性分析 由图 5 可知,6 只免疫兔的 icELISA 抑制曲线具有良好的线性关系,OAE 组敏感性最好,IC₅₀ 为 10.32 μg·kg⁻¹,其他各组敏感性均逊色于 OAE 组。



注: B/B₀: B 为 AFB₁ 不同浓度时的吸光值,

B₀ 为 AFB₁ 浓度为 0 mg·L⁻¹ 时的吸光值。

Note: B/B₀: B is the absorbance value of AFB₁ at different concentrations, and B₀ is the absorbance value when concentration of AFB₁ is 0 mg·L⁻¹.

图 5 AFB₁ pAb 对 AFB₁ 的 icELISA 敏感性测定

Fig.5 The sensitivity measurement of AFB₁ pAb to AFB₁ by icELISA

2.2.3 特异性与广谱性分析 由表 4 可知,6 种方法所制备的抗体均能 100% 识别 AFB₁,其中 OAE 法的特异性和广谱性最好,IC₅₀ 为 10.32 μg·kg⁻¹,与 AFB₂ 的 CR 为 75.21%;与 AFG₁、AFG₂ 的 CR 分别为 44.13% 和 14.72%。其他方法制备的抗体特异性很好,均能

表3 AFB₁ pAb对 AFB₁ icELISA 测定曲线的回归方程、
R²值和 IC₅₀值

Table 3 The regression equation, R² and IC₅₀
of AFB₁ pAb to AFB₁ by icELISA

组别 Group	回归方程 Regression equation	R ² 值 R ² value	IC ₅₀ /(μg·kg ⁻¹)
OAE	y=-32.171x+82.621	0.9916	10.32
MOA	y=-31.822x+99.59	0.9943	36.18
MA	y=-31.546x+97.263	0.9938	31.49
SA	y=-32.875x+92.292	0.9966	19.36
EP	y=-25.245x+99.481	0.9932	91.21
EED	y=-22.979x+107.18	0.9894	307.81

表4 AFB₁ pAb与 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、AFM₁、AFM₂ 的交叉反应

Table 4 The percent cross-reactivity of AFB₁ pAb with AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂

AF	AFB ₁ pAb(OAE)		AFB ₁ pAb(MOA)		AFB ₁ pAb(MA)		AFB ₁ pAb(SA)		AFB ₁ pAb(EP)		AFB ₁ pAb(EED)	
	IC ₅₀ /(μg·kg ⁻¹)	交叉 反应 率 CR /%	IC ₅₀ (μg·kg ⁻¹)	交叉 反应 率 CR /%	IC ₅₀ /(μg·kg ⁻¹)	交叉 反应 率 CR /%						
AFB ₁	10.32	100	36.18	100	31.49	100	19.36	100	91.21	100	307.81	100
AFB ₂	13.72	75.21	46.03	78.61	46.85	67.22	23.83	81.26	144.14	63.28	590.13	52.16
AFG ₁	23.39	44.13	>10 ³	<0.5	>10 ³	<0.5	35.67	54.27	>10 ³	<0.5	>10 ³	<0.5
AFG ₂	70.11	14.72	>10 ³	<0.5	>10 ³	<0.5	79.41	24.38	>10 ³	<0.5	>10 ³	<0.5
AFM ₁	63.08	16.36	741.39	4.88	615.04	5.12	541.74	3.68	>10 ³	<0.5	>10 ³	<0.5
AFM ₂	716.67	1.44	>10 ³	<0.5	>10 ³	<0.5	>10 ³	<0.5	>10 ³	<0.5	>10 ³	<0.5

引入不同连接臂长度均会对小分子的性质和结构产生较大影响,进而影响产生抗体的质量^[24]。本研究根据 BGAFs 的分子结构特征,分别选择 1 位羰基、2 位活泼氢、3 位羟基和醛基、3 位与 4 位之间双咪唑环作为活性基团,通过不同的化学反应方式,分别引入可以利用的羧基、羟基、氨基等活性基团,实现了与载体蛋白偶联合成人工抗原的目的。

3.2 BGAFs 人工抗原的合成路线

目前,关于 BGAFs 人工抗原合成方法的研究仍停留在经验层面,多采用试错法,尽管建立了多种人工抗原鉴定方法,但所制备人工抗原的免疫原性如何,最终还需通过动物免疫的效果得以证实^[25]。本研究在参考大量相关文献的基础上,以 AFB₁ 作为反应起始物,采用 OAE、MOA、MA、SA、EP 和 EED 6 种方法合成人工抗原,并通过 UV、SDS-PAGE 进行抗原鉴定,用动物免疫进行抗体特性分析,筛选出 BGAFs 抗体制备最为理想的抗原合成方法是 OAE 法,其优点在于反应体系

100%识别 AFB₁,但其敏感性和广谱性不如 OAE 法所制备的抗体。综上表明,制备针对 BGAFs 敏感性高、特异性强、广谱性好的抗体,最好的抗原合成方法是 OAE 法。

3 讨论

3.1 BGAFs 抗原合成方法设计

BGAFs 中 AFB₁、AFB₂ 的分子量分别为 312.27 和 314.29,属于小分子半抗原,无免疫原性。依据半抗原-载体效应理论,只有与大分子蛋白质载体结合成人工抗原,才能获得针对半抗原的特异性抗体,因此,抗原合成方法至关重要^[23]。由于选择不同活性位点和

易于构建,反应条件温和,操作步骤简单,产物产率较高。但就本研究所采用的技术路线的先进性而言,分子模拟、计算机辅助等技术方面的研究与应用仍有待提高^[26-27]。

3.3 BGAFs 人工抗原的免疫效果分析

本研究旨在筛选出 BGAFs 人工抗原合成方法,为灵敏度高、特异性强、识别谱广的 BGAFs 高质量抗体的制备奠定物质和技术基础,这就要求在 BGAFs 抗原合成设计中,一方面要考虑抗体对 AFB₁ 的特异性和敏感性,以满足 AFB₁ 限量标准下的检测技术要求;另一方面要考虑抗体对 AFB₂ 的敏感性和广谱性,以满足 BGAFs 限量标准下的检测技术要求^[28]。谢琿等^[29]采用 MA 法合成 AFB₁-BSA,筛选出杂交瘤细胞 3B9 获得 AFB₁mab,该抗体特异性识别 AFB₁,灵敏度达到 1.04 μg·kg⁻¹,与 AFB₂、AFG₁、AFG₂、AFM₁ 的 CR 分别为 2.2%、33.9%、1.8% 和 5.12%,与 AMF₂ 无 CR,广谱性较差。肖智等^[30]采用 SA 法合成 AFB₁-BSA,筛

选出杂交瘤细胞 3A12 获得 AFB₁ mab, 该抗体特异性识别 AFB₁, 灵敏度达到 $6.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 与 AFB₂、AFG₁、AFG₂、AMF₁ 的 CR 分别为 7.8%、20.2%、0.6% 和 3.68%, 与 AFM₂ 无 CR, 同样存在广谱性差的问题。本研究通过 6 种不同抗原合成方法合成 BGAFs 人工抗原 AFB₁-BSA, 结果表明, OAE 法效果最好, 所产生 AFB₁ pAb 抗体效价高, 间接 ELISA 效价达到 $1:(1.28 \times 10^4)$; 对 AFB₁ 敏感性好, IC₅₀ 为 $10.32 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 特异性强, 可 100% 识别 AFB₁, 与 AFB₂、AFG₁、AFG₂、AMF₁、AFM₂ 的 CR 分别为 75.21%、44.13%、14.72%、16.36% 和 1.44%。本研究所设计的其他 5 种方法存在不同程度的缺陷, 因此建议除开展研究工作之外, 一般不予采用。

4 结论

本研究根据 AFB₁ 的分子结构特征和已有活性位点, 设计出 6 种 BGAFs 抗原合成方法, 通过 UV、SDS-PAGE 鉴定和免疫动物所产生的 AFB₁ pAb 特性分析, 获得了高效价、敏感、特异、广谱的 AFB₁ pAb。表明抗原合成设计是制备高质量抗体的前提, OAE 法是实现 BGAFs 高质量抗体制备的有效途径, 这为 BGAFs 免疫检测方法的建立奠定了物质和技术基础。

参考文献:

[1] Sun D D, Gu X, Li J G, Yao T, Dong Y C. Quality evaluation of five commercial enzyme linked immunosorbent assay kits for detecting aflatoxin B₁ in feedstuffs[J]. Asian Australasian Journal of Animal Sciences, 2015, 28(5):691-696

[2] Luo X, Xing J, Qi L, Yang M, Wang L, Li Y, Chen Z. *In vivo* toxicity assessment of aflatoxin B₁ contaminated corn after ozone degradation[J]. Food Additives and Contaminants. Part A, 2018, 35(2):341-350

[3] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S]. 中华人民共和国国家标准, 2017

[4] Gefen T, Vaya J, Khatib S, Rapoport I, Lupo M, Bamea E, Admon A, Heller E D, Aizenshtein E, Pitcovski J. The effect of haptens on protein-carrier immunogenicity[J]. Immunology, 2015, 144(1):116-126

[5] Mongkon W, Sugita-Konishi Y, Chairri W, Surivathaporn W. Aflatoxin B₁ Contamination of dairy feeds after storage in farm practice in tropical environment[J]. Biocontrol Science, 2017, 22(1):41-45

[6] 肖理文, 徐秀, 赵皖, 朱超, 陈爱亮. 基于时间分辨荧光纳米微球的黄曲霉毒素 B₁ 快速定量检测试纸条的研制及性能研究[J]. 粮食加工, 2017, 42(4):44-46

[7] Kolosova A Y, Shim W B, Yang Z Y, Eremin S A, Chung D H. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples [J]. European Journal of Human Genetics, 2006, 12(1):13-23

[8] Yu Y Y, Chen Y Y, Gao X, Liu Y Y, Zhang H Y, Wang T Y. Nanoparticle based bio-bar code technology for trace analysis of aflatoxin B1 in Chinese herbs [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2018, 26(2):815-822

[9] 王亚楠, 王晓斐, 牛琳琳, 雷壮, 张海棠, 王自良. 黄曲霉毒素 B₁ 半抗原分子设计与抗原合成及抗体特性研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(23):367-376

[10] Zhou Y K, Wu J J, Yu W, Xu Y, Wang P, Xie B J, Chen F S. Preparation for aflatoxin B₁-cationized bovine serum albumin based on Mannich-type reaction [J]. Journal of Immunological Methods, 2007, 328(1/2):79-88

[11] Gaur P K, Lau H P, Pestka J J, Chu F S. Production and characterization of aflatoxin B_{2a} antiserum [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1981, 41(2):478-482

[12] Rushing B R, Selim M I. Structure and oxidation of pyrrole adducts formed between aflatoxin B_{2a} and biological amines [J]. Chemical Research in Toxicology, 2017, 30(6):1275-1285

[13] Kononenko G, Burkin A, Soboleva N. Comparative characterization of immune reagents based on hemiacetals of aflatoxin B₁ and sterigmatocystine [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2002, 38(5):487-492

[14] 王亚楠, 王晓斐, 牛琳琳, 雷壮, 张海棠, 王自良. 食品中黄曲霉毒素总量免疫分析方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(13):344-351

[15] Martin C N, Garner R C. Aflatoxin B-oxide generated by chemical or enzymic oxidation of aflatoxin B₁ causes guanine substitution in nucleic acids[J]. Nature, 1977, 267(5614):863-865

[16] 王亚楠, 王晓斐, 王自良. 食品黄曲霉毒素总量检测方法的研究与应用[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(1):285-290

[17] Cervino C, Knopp D, Weller M G, Niessner R. Novel aflatoxin derivatives and protein conjugates [J]. Molecules, 2007, 12(3):641-653

[18] 王亚楠, 王淑云, 张海棠, 王自良. 抗重金属 Cd²⁺ 单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立及其免疫学特性鉴定 [J]. 西北农业学报, 2014, 23(11):24-29

[19] 句荣辉, 温凯, 段丽丽, 罗红霞. 丙烯酰胺特异性多克隆抗体的制备及鉴定 [J]. 核农学报, 2015, 29(10):1979-1984

[20] 赵欢欢, 张钟仁, 李学俊, 陈鹏. 苦荞黄酮醇合酶 FIFLS2 的重组表达及多克隆抗体制备 [J]. 核农学报, 2016, 30(2):240-245

[21] 陈彤, 王常青, 李小凡, 郝志萍. 间接 ELISA 检测不同贮存条件下花生中黄曲霉毒素 B₁ [J]. 中国油脂, 2014, 39(9):88-91

[22] 张弛, 潘家荣, 帅瑞琪, 方豪, 冯依璠. 动物性食品中硝基咪唑类兽药残留酶联免疫检测方法的建立 [J]. 核农学报, 2016, 30(2):323-331

[23] Zeng H, Chen J, Zhang C, Huang X A, Sun Y, Xu Z, Lei H. Broad-specificity chemiluminescence enzyme immunoassay for

- (fluoro)quinolones: Hapten design and molecular modeling study of antibody recognition[J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(7):3909-3916
- [24] 施海燕,王鸣华.半抗原的间隔臂长度对免疫识别的影响[J].农业学学报, 2008, 10(2): 172-177
- [25] 郭乃菲, 于基成, 马福敏, 郭小瑞, 徐美玲, 党亚丽, 范永梅, 宫凯莹. 常用人工抗原鉴定方法的比较[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(5):517-521
- [26] Morita I, Oyama H, Yasuo M, Matsuda K, Katagi K, Ito A, Tatsuda H, Tanaka H, Morimoto S, Kobayashi N. Antibody fragments for on-site testing of cannabinoids generated via *in vitro* affinity maturation[J]. Biological Pharmaceutical Bulletin, 2017, 40(2):174-181
- [27] Hayashi N, Saegusa J, Uto K, Oyabu C, Saito T, Sato I, Kawano S, Kumagai S. Evaluation of a computer-aided microscope system and its anti-nuclear antibody test kit for indirect immunofluorescence assay[J]. The Japanese Journal of Clinical Pathology, 2016, 64(2):142-151
- [28] 王亚楠. 黄曲霉毒素广谱特异性抗体的制备及总量检测免疫试纸方法的建立[D]. 新乡:河南科技学院, 2017
- [29] 谢琿, 章先, 王歆, 凡鹏程, 时玉菲, 方维焕. 黄曲霉毒素 B₁ 单克隆抗体的制备及间接竞争 ELISA 检测技术研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(10): 2033-2040
- [30] 肖智, 李培武, 张奇, 张文, 丁小霞. 高特异性黄曲霉毒素 B₁ 单克隆抗体的制备及特性研究[J]. 中国油料作物学报, 2011, 33(1):66-70

Design of Antigen Synthesis and Characterization of Specific and Eurytopic Antibodies Against B-group Aflatoxins

ZHANG Haitang¹ WANG Xiaofei¹ ZHI Aimin² WANG Yanan¹ WANG Ziliang^{1,*}

(¹The Animal Science and Technology College, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang,

Henan 453003; ²Henan Xu Rui Food Co., Ltd., Jiaozuo, Henan 454150)

Abstract: The aim of this study was to prepare B-group aflatoxins (BGAFs) antibody with strong specificity and goodeurytopicity. According to the molecular structure and active site of aflatoxin B₁ (AFB₁), the BGAFs artificial antigen AFB₁-BSA was prepared by 6 methods including oxime active ester (OAE), methylation of ammonia (MOA), mixed anhydride (MA), semi acetal (SA), epoxide (EP) and enol ether derivative (EED) and identified by UV and SDS-PAGE. Polyclonal antibodies against AFB₁ (AFB₁ pAb) were prepared by immunizing New Zealand rabbits with AFB₁-BSA, and the titers of AFB₁ pAb was detected by indirect ELISA, the sensitivity of AFB₁ pAb was analyzed by indirect competitive ELISA (icELISA) and the specificity and eurytopicity of AFB₁ pAb was analyzed by cross-reactivity (CR) test. The results showed that AFB₁-BSA was synthesized successfully and the best one was OAE method among the six synthesis methods of BGAFs artificial antigen and its conjugation ratio of AFB₁ to BSA was 8.46:1. The immune efficacy of OAE method was the best, that its AFB₁ pAb had the highest titers of 1:1.28×10⁴ by indirect ELISA, a good sensitivity with the 50% inhibition concentration (IC₅₀) of 10.32 μg·L⁻¹ to AFB₁ by icELISA and showed a high CR to AFB₂ of 75.21%, AFG₁ of 44.13%, AFG₂ of 14.72%, AFM₁ of 16.36% and AFM₂ of 1.44%, respectively. In this study, AFB₁ pAbs with high titer, sensitivity, specificity and eurytopicity were prepared, proving a technical support for the establishment of BGAFs immunoassay.

Keywords: B-group aflatoxins, antigen synthesis design, polyclonal antibody, characteristics analysis